



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa

AVALIAÇÃO DE STRESS OXIDATIVO EM BAGOS DE VIDEIRA (*Vitis vinifera* L.) DA CASTA ‘TRINCADEIRA’ EM CONDIÇÕES DE STRESS HÍDRICO

Inês Sequeira de Carvalho

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica - Hortofruticultura e Viticultura

Orientador: Maria Luísa Louro Martins

Co-orientador: Rita Maria de Brito Francisco

Júri:

Presidente: - Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: - Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Engenheira Rita Maria de Brito Francisco, na qualidade de especialista.

Lisboa, 2009

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Luísa Louro, pela oportunidade que me foi concedida e pelo apoio incondicional e dedicação ao longo da realização deste trabalho, além da simpatia e boa disposição que sempre demonstrou, mesmo nos momentos mais difíceis. O seu profissionalismo bem como os preciosos ensinamentos transmitidos contribuíram grandemente para o meu aperfeiçoamento durante o desenvolvimento deste trabalho e em trabalhos futuros.

À minha co-orientadora, Eng. Rita Francisco, pela constante disponibilidade demonstrada, mesmo no estrangeiro, e pela preciosa ajuda na parte laboratorial deste trabalho, bem como pela cuidada revisão.

Ao Professor Miguel Mourato, pela constante presença e apoio ao longo da realização do trabalho, e pelos ensinamentos no tratamento estatístico dos dados apresentados.

À Professora Manuela Chaves, pela disponibilização de recursos que permitiram a realização deste trabalho e pelo apoio, profissionalismo e simpatia que sempre demonstrou.

À equipa do LEM no ITQB, Ana Regalado, Ana Rodrigues, Miguel Costa, Olfa Zarrouk, Rhaissa Santos, Rita Francisco e Tanise, que além do apoio demonstrado durante a minha passagem pelo ITQB, tornaram as horas de laboratório muito mais agradáveis, e também pela total disponibilidade de dados e informação relevantes para a elaboração deste trabalho.

Ao Sérgio e à Alíria, com quem partilhei o laboratório 17.A durante largos meses, em que fomos descobrindo em conjunto os segredos do trabalho de laboratório.

À Ana Isabel e à Christine, pelos ensinamentos nas técnicas de determinação de actividades enzimáticas e de outras técnicas de laboratório essenciais para o sucesso deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de curso, Ana Girão, Ana Pacheco, Ana Taniças, Catarina Madaleno, Manuela Nunes, Patrícia Gonçalves e Pedro Cabrita, pela constante presença e amizade ao longo de todo o curso, e que me ajudaram a atingir esta meta.

Um especial agradecimento ao meu namorado, Carlos França, por todo o apoio demonstrado do princípio ao fim do trabalho, pela paciência que sempre mostrou, pelos preciosos conselhos que em muito ajudaram à realização deste trabalho e principalmente pela sua presença, que só por si fez toda a diferença.

À minha irmã, Margarida, pela ajuda na elaboração do resumo alargado e pela força que sempre me transmitiu.

Aos meus Pais, a quem dedico este trabalho, pela eterna paciência e apoio ao longo de todo o curso e de toda a minha vida. Não tenho palavras para expressar toda a minha admiração por vós. Muito Obrigada por tudo!

A todos aqueles que contribuíram directa ou indirectamente para a realização deste trabalho e que, por lapso, omiti.

Resumo

A resposta da planta ao stresse oxidativo inclui a activação de mecanismos antioxidantes de defesa, que surge como parte integrante das estratégias de tolerância ao stresse hídrico. Neste trabalho, procurou-se avaliar o stresse oxidativo provocado por três regimes hídricos distintos – NI (Non Irrigated) RDI (Regulated Deficit Irrigation) e FI (Full Irrigated) – na película de bagos de *Vitis vinífera* L. da cultivar ‘Trincadeira’ ao longo do processo de maturação. Foi determinada a actividade das enzimas antioxidantes guaiacol-peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO), ascorbato-peroxidase (APX), glutathione-redutase (GR) e catalase (CAT) em diferentes estados de maturação. Os maiores níveis de stresse hídrico provocados pelo regime NI, a que correspondem níveis enzimáticos médios mais elevados para a enzima POD, originaram possivelmente maior stresse oxidativo, seguido do regime RDI e FI, a que correspondem níveis de stresse hídrico respectivamente inferiores. A disponibilidade hídrica parece afectar a resposta da planta à acumulação de ROS em diferentes fases da maturação, observando-se uma resposta mais eficaz na fase final da maturação no regime NI e na fase do pintor para os regimes RDI e FI, o que pode indicar o maior investimento da planta na fase final do ciclo reprodutivo em condições limitantes da disponibilidade de água.

Palavras-chave: enzimas antioxidantes, estado de maturação, película de bago, stresse hídrico, stresse oxidativo, *Vitis Vinífera* L.

Abstract

The plants respond to oxidative stress with the activation of defensive antioxidants mechanisms, which come up as an integrative part of the drought stress tolerance strategies. With this work it was attempted to evaluate oxidative stress caused by three different irrigation treatments – NI (non irrigated), RDI (Regulated Deficit Irrigation) and FI (Full Irrigation) – in the skin of *Vitis vinifera* L. cv 'Trincadeira' grapes, throughout ripening process. The activity of guaiacol peroxidase (POD), poliphenol oxidase (PPO), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR) and catalase (CAT) was determined on different stages of ripening. Higher levels of drought stress were found in NI treatment, with the highest average levels of POD activity, and have originated possibly a major incidence of oxidative stress, followed by RDI and FI treatments, where the level of drought stress was respectively minor. Water availability seems to affect the plant's response to the accumulation of ROS on the different stages of ripening, showing a more efficient response on the final stage in NI treatment and on *vérasion* on RDI and FI treatments, which may indicate a higher investment of the plant on the final stage of the reproductive cycle under limited water availability.

Keywords: antioxidant enzymes, drought stress, grape skin, oxidative stress, ripening stage, *Vitis vinífera* L.

Title: Evaluation of the oxidative stress in grape skin of *Vitis vinifera* L., cv 'Trincadeira' as a consequence of drought stress.

Extended Abstract

The knowledge of plants resistance/tolerance mechanisms to adverse environmental conditions is of the most importance, since it allows an adaptation of plant's growth conditions and the optimization of yield and quality of various agricultural crops.

Although water deficit causes significant losses on vegetal productivity, the shortage of hydric resources that has started to take place all over the world raised the question of irrigation methods usually used in irrigated crops. First approaches to the concept of deficit irrigation for saving water in agriculture started to emerge, along with the investigation of resistance/tolerance mechanisms of plants towards hydric stress and the influence of water deficit throughout different stages of crop development. Since then, this has been on the spotlight of investigation globally, that has enabled the development of new irrigation methods that not only allow saving of water resources, but also increasing of production's quality.

Drought stress sets up an adverse environmental condition to the development of plants, causing an increase of intracellular production of Reactive Oxygen Species (ROS) that induce changes on a physiological and biochemical level, that characterize oxidative stress. The plants respond to oxidative stress with the activation of defensive antioxidants mechanisms, which come up as an integrative part of the drought stress tolerance strategies.

With this work it was attempted to evaluate oxidative stress caused by three different irrigation treatments – NI (non irrigated), RDI (Regulated Deficit Irrigation) and FI (Full Irrigation) – in the skin of *Vitis vinifera* L. cv 'Trincadeira' grapes, throughout ripening process. The activity of guaiacol peroxidase (POD), poliphenoloxidase (PPO), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR) and catalase (CAT) was determined on different stages of ripening. The results showed that each irrigation treatment caused different behaviors on the enzymes studied.

POD seems to act like the major transmitter of ROS removal, in this case H_2O_2 , since it has presented the highest levels of activity throughout the ripening process, in all irrigation treatments studied.

PPO presented higher enzyme levels on the first stages of ripening, decreasing afterword with the increasing of the ripening stage and drought stress, in all treatment studied.

APX held a decrease throughout the ripening process, more evident on RDI and FI, that can indicate its role on the modulation of small amounts of H_2O_2 for molecular signaling effects as a response to oxidative stress conditions and the elimination of small amounts ROS on the initial ripening stages.

GR presented a similar variation to the one observed in POD, which can indicate that in this situation this enzyme acts mainly in the regeneration of GSH used as substrate by glutathione-peroxidase (GPX), a peroxidase similar to POD, which acts in the elimination of H_2O_2 mainly in cytosol. The discrepancy observed between the behavior of GR and APX seems to indicate that GR does not take significant part on the glutathione-ascorbate cycle.

It can be concluded that, on the level of influence of the different irrigation treatments on the oxidative stress throughout the ripening process, on average NI treatment has originated higher levels of POD enzyme, followed by RDI and FI treatments, which is related to a higher incidence of oxidative stress on plants that are subjected to higher drought stress given by NI, RDI and FI, respectively. Water availability seems to affect the plant's response to the accumulation of ROS on the different stages of ripening, showing a more efficient response on the final stage in NI treatment and on *vérasion* on RDI and FI treatments, which may indicate a higher investment of the plant on the final stage of the reproductive cycle under limited water availability.

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	IV
Extended Abstract	V
Índice	VII
Lista de Figuras	IX
Símbolos e Abreviaturas	X
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1 O metabolismo aeróbio e o stresse oxidativo.....	3
2.1.1 Origem e formação de ROS nas plantas.....	5
2.1.2 Formação de ROS em consequência do stresse oxidativo.....	6
2.1.3 Mecanismos de eliminação do efeito nocivo de ROS.....	8
2.2 Relações hídricas da videira e evolução da maturação dos bagos.....	13
2.2.1 Ecofisiologia da videira em condições de défice hídrico.....	13
2.2.2 A rega da vinha.....	14
2.2.2.1 Rega deficitária da vinha.....	15
2.2.3 Desenvolvimento dos bagos.....	16
2.2.4 Constituição da película.....	17
3. Material e Métodos.....	19
3.1 Material Vegetal e Condições Experimentais.....	19
3.2 Extracção enzimática.....	20
3.3 Determinação da actividade enzimática.....	20
3.3.1 Medição da actividade enzimática da guaiacol-peroxidase.....	21
3.3.2 Medição da actividade enzimática da polifenol-oxidase.....	22
3.3.3 Medição da actividade enzimática da catalase.....	22
3.3.4 Medição da actividade enzimática da glutathiona-redutase.....	22

3.3.5 Medição da actividade enzimática da ascorbato-peroxidase.....	23
3.4 Quantificação da proteína solúvel.....	23
3.5 Tratamento Estatístico dos dados.....	24
4. Optimização das condições de extracção.....	25
4.1 Considerações gerais.....	25
4.2 Procedimento Experimental 1.....	25
4.3 Procedimento Experimental 2.....	27
4.4 Procedimento Experimental 3.....	28
4.5 Procedimento Experimental 4.....	29
5. Resultados e Discussão.....	31
5.1 Guaiacol-peroxidase (POD).....	31
5.2 Polifenoloxidase (PPO).....	34
5.3 Ascorbato-peroxidase (APX).....	36
5.4 Glutathione-redutase (GR).....	39
5.5 Catalase (CAT).....	42
6. Conclusões.....	43
7. Referências Bibliográficas.....	45

Anexo

Lista de Figuras

Figura 2.1 – Reacções sequenciais de formação de ROS.....	3
Figura 2.2 – Mecanismos enzimáticos de eliminação de ROS: (a) Ciclo da glutatona-ascorbato. (b) Ciclo da glutatona peroxidase (GPX). (c) Catalase (CAT). (d) Superoxido-dismutase.....	9
Figura 2.3 – Diferentes camadas constituintes da película do bago.....	18
Figura 5.1 – Actividade Enzimática da enzima POD ao longo do processo de maturação nos três regimes hídricos. (a) NI (b) RDI (c) FI. As barras representam as médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($P<0,05$).....	33
Figura 5.2 – Actividade Enzimática da enzima PPO ao longo do processo de maturação nos três regimes hídricos. (a) NI (b) RDI (c) FI. As barras representam as médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($P<0,05$).....	35
Figura 5.3 – Actividade Enzimática da enzima APX ao longo do processo de maturação nos três regimes hídricos. (a) NI (b) RDI (c) FI. As barras representam as médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($P<0,05$).....	38
Figura 5.4 – Actividade Enzimática da enzima GR ao longo do processo de maturação nos três regimes hídricos. (a) NI (b) RDI (c) FI. As barras representam as médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($P<0,05$).....	41

Símbolos e Abreviaturas

APX	Ascorbato-peroxidase
AsA	Ascorbato na forma reduzida
ATP	Adenosina Trifosfatada
CAT	Catalase
DHA	Desidroascorbato
DTNB	5.5' – ditiobis (2 – ácido nitrobenzóico)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ET	Evapotranspiração
FI	<i>Full Irrigated</i>
GR	Glutathione-redutase
GSH	Glutathione na forma reduzida
GSSG	Glutathione na forma oxidada
MDHA	Monodesidroascorbato
MDHAR	Monodesidroascorbato-redutase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NI	<i>Non Irrigated</i>
POD	Guaiacol-peroxidase
PPO	Polifenol oxidase
PVPP	Polivinil(polipirrolidona)
RDI	<i>Regulated Deficit Irrigated</i>
ROS	Espécies Reactivas de Oxigénio
SOD	Superóxido-dismutase

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento dos mecanismos de resistência/tolerância das plantas a condições ambientais desfavoráveis reveste-se da maior importância, uma vez que permite a adequação das condições de crescimento das plantas e a optimização da produção e qualidade de diversas culturas agrícolas em diferentes condições ambientais.

Apesar de o défice hídrico provocar reduções importantes na produtividade vegetal, a escassez existente a nível de recursos hídricos que começou a ter lugar um pouco por todo o mundo pôs em causa os métodos de rega vulgarmente utilizados nas culturas agrícolas de regadio. Começaram a surgir as primeiras abordagens ao conceito de rega deficitária para a diminuição do uso de água na agricultura, a par com a investigação dos mecanismos de resistência/tolerância das plantas ao stresse hídrico e a influência do défice hídrico nas diferentes fases de desenvolvimento das culturas. Desde então, esta tem sido uma área de destaque na investigação a nível global, que levou ao desenvolvimento de novos métodos de rega que permitem não só a poupança de recursos hídricos como, em muitos casos, o aumento da qualidade das produções.

Neste sentido, a videira (*Vitis vinifera* L.) tem sido um objecto de estudo muito utilizado na compreensão dos mecanismos de resposta ao stresse hídrico, não só porque representa uma cultura de grande importância económica a nível mundial, mas também porque a sua produção está tradicionalmente ligada a regiões de menor disponibilidade hídricas, como por exemplo regiões de clima Mediterrânico.

As plantas desenvolveram vários mecanismos antioxidantes de defesa que lhes permitem fazer face à produção excessiva de Espécies Reactivas de Oxigénio (do inglês *ROS – Reactive Oxygen Species*) que ocorre em situações adversas como o défice hídrico. A acção directa ou indirecta das ROS pode proporcionar diversas alterações de ordem fisiológica e bioquímica que no seu conjunto caracterizam o stresse oxidativo, com consequências negativas ao nível da fotossíntese, trocas gasosas e respiração, entre outros. O aumento dos níveis de actividade das principais enzimas responsáveis pela remoção de ROS constitui uma resposta bioquímica importante em termos de defesa e resistência da planta a situações adversas, e permite avaliar o stresse oxidativo provocado pelos agentes bióticos ou abióticos desfavoráveis, assim como pela sua intensidade e/ou duração sobre a planta.

Face a estes condicionantes, a avaliação do stresse oxidativo provocado por diferentes graus de stresse hídrico em vários constituintes de plantas da espécie *V. vinifera* constitui uma base fundamental para o melhoramento da espécie tendo como objectivo o aumento da resistência a este tipo de stresse.

O objectivo deste trabalho foi a avaliação do potencial stresse oxidativo provocado por três regimes hídricos distintos em bagos de uva da cultivar 'Trincadeira'. Para tal determinaram-se actividades de enzimas do sistema antioxidativo: guaiacol-peroxidase (POD), polifenol oxidase (PPO), ascorbato-peroxidase (APX), glutathione-redutase (GR) e catalase (CAT), ao longo do processo de maturação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O metabolismo aeróbio e o stresse oxidativo

Os organismos fotossintéticos aeróbios como as plantas terrestres, evoluíram desde o seu aparecimento na presença de oxigénio atmosférico. Desenvolveram vias metabólicas capazes de utilizar o grande potencial energético do oxigénio. A redução de O_2 a H_2O na respiração mitocondrial é um processo gerador de ATP que constitui uma das fontes de energia necessária ao metabolismo dos organismos aeróbicos.

Existem, no entanto, consequências nefastas procedentes da redução do O_2 . A redução parcial do oxigénio molecular origina formas moleculares reactivas designadas Espécies Reactivas de Oxigénio (ROS). As ROS são consideradas sub-produtos do metabolismo aeróbio das plantas (respiratório e fotossintético), sendo indissociáveis da vida com oxigénio. A sua formação (**Figura 2.1**) resulta da alteração do estado estacionário da molécula de oxigénio, com formação de singleto de oxigénio (1O_2) ou da transferência de um, dois ou três electrões para o O_2 para formar, respectivamente, o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), ou o radical hidroxilo (OH^{\cdot}) (Mittler, 2002).

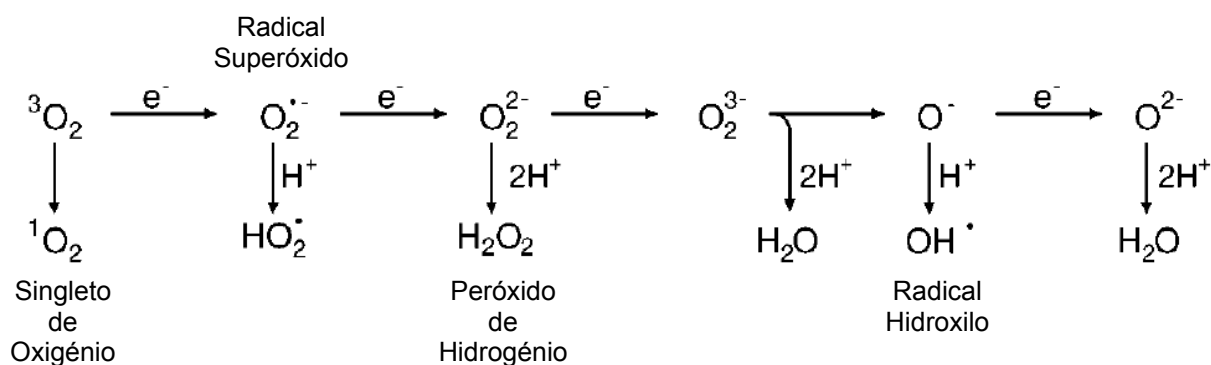


Figura 2.1 – Reacções sequenciais de formação de ROS. (Adaptado de Apel & Hirt, 2004)

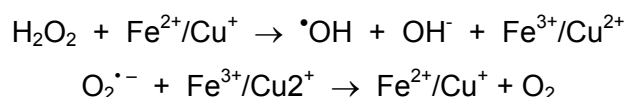
De acordo com Vangronsveld & Clijsters (1994) o stresse oxidativo é definido como o conjunto de alterações fisiológicas, resultantes da acção directa ou indirecta das ROS, com acção inibitória de enzimas, e que afectam os processos metabólicos, nomeadamente a respiração, fotossíntese, fixação do CO_2 , trocas gasosas e outros. A formação de ROS é contínua no metabolismo aeróbio. Os organismos estão metabolicamente preparados para

eliminar quantidades controladas dessas espécies, mas em condições de stresse há aumento da produção intracelular de ROS, pelo que os mecanismos normais de defesa não são suficientes para os eliminar, e dessa forma anular o seu efeito adverso (Martins & Mourato, 2008). Nessas condições, há formação de ROS em excesso, que tem efeitos nocivos para as plantas, podendo causar a oxidação de vários componentes celulares e mesmo levar à destruição oxidativa da célula (Dat *et al.* 2000, Hammond-Kosack 1996, Moller *et al.* 2007).

O radical superóxido $O_2^{\bullet-}$ é altamente reactivo, com uma semi-vida de aproximadamente 2-4 μ s (Knox & Dodge, 1985; Smirnov, 1993; Sutherland, 1991). Reage principalmente com os centros Fe-S de proteínas (Moller *et al.* 2007) e, no interior da célula, a sua acção inicia reacções de peroxidação de lípidos (Dat *et al.* 2000), causando destabilização das membranas celulares. De acordo com Knox & Dodge (1985), alguns aminoácidos específicos, como a histidina, metionina e triptofano podem também ser oxidados pelo $O_2^{\bullet-}$.

O peróxido de hidrogénio, H_2O_2 , é uma molécula de semi-vida relativamente longa (1ms), com a capacidade de atravessar membranas, possivelmente através de aquaporinas (Moller *et al.* 2007). A sua toxicidade prende-se essencialmente com a oxidação de grupos tiol (SH), provocando alterações na fracção proteica e, conseqüentemente, inactivação enzimática.

O radical hidroxilo OH^\bullet , com uma semi-vida curta de menos de 1 μ s, detém um grande potencial oxidativo, sendo considerado muito reactivo. Embora tenha semi-vida curta é particularmente difícil de eliminar dado que não são conhecidas moléculas específicas que o consiga degradar, pelo que é mais vantajoso para a célula eliminar os seus precursores (Moller *et al.* 2007). Na presença de metais de transição, como o Fe^{3+} e o Cu^{2+} , o radical hidroxilo é produzido a partir do $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 através da Reacção de Fenton (Mithofer *et al.* 2004, Moller *et al.* 2007):



Esta reacção ocorre no cloroplasto, ou outros compartimentos celulares, em condições de stresse oxidativo.

Este radical pode desencadear reacções de peroxidação de lípidos membranares insaturados, que causam aumento da permeabilidade das membranas e perda da compartimentação celular, e estas reacções em cadeia geram radicais livres cujo efeito se propaga a outros constituintes celulares (Vangronsveld & Clijsters, 1994).

2.1.1 Origem e funções das ROS nas plantas

Existem diversas fontes de ROS nas plantas. As mais comuns incluem a transferência de electrões para o O_2 a partir da cadeia de transporte electrónico no cloroplasto e na mitocôndria e a fotorrespiração nos peroxissomas (Dat *et al.* 2000).

Os cloroplastos constituem a maior fonte de ROS nas plantas (Foyer *et.al.* 1994). A sua formação está relacionada com a transferência de electrões do NADPH para o O_2 como aceitador alternativo ao CO_2 , na fase escura da fotossíntese. A maioria das plantas não possui mecanismos de fixação de CO_2 suficiente para beneficiar de mais do que 50 % da energia luminosa absorvida (Baker, 1991), pelo que são utilizados aceitadores de electrões alternativos, incluindo o O_2 . Assim, condições que limitem a fixação de CO_2 conduzem ao aumento da acumulação de ROS à medida que mais moléculas de O_2 são utilizadas como aceitadores de electrões.

A cadeia transportadora de electrões, na membrana tilacóide do cloroplasto inclui um grupo de enzimas auto-oxidáveis associadas à fase redutora do fotossistema I: centros Fe-S, tioredoxina reduzida e ferredoxina (Noctor & Foyer, 1998). Em circunstâncias limitantes da disponibilidade de $NADP^+$, existe formação do radical superóxido devido à redução do O_2 pelas enzimas acima referidas (Biehler & Fock, 1996).

Na fotorrespiração é formado H_2O_2 como consequência da oxidação do glicolato, catalizada pela enzima glicolato-oxidase. A fotorrespiração resulta da actividade oxigenásica da Ribulose-1,5-bifosfato (*Rubisco*), para conversão do ácido 2-fosfoglicólico formado pela fixação de O_2 permitindo assim a recuperação de parte do CO_2 que não era fixado. Neste processo, o ácido 2-fosfoglicólico é hidrolisado a glicolato no estroma e transportado para os peroxissomas, onde é oxidado a glioxilato pela enzima glicolato-oxidase, com formação de H_2O_2 (Taiz & Zeiger, 1992).

A maior fonte de ROS associada ao processo respiratório reside na cadeia transportadora de electrões, na membrana interna da mitocôndria, particularmente ao nível dos complexos I e II (Navrot, 2007). De acordo com este autor, a sobre-redução da *pool* de ubiquinona pelo complexo I pode induzir o funcionamento inverso da cadeia e, consequentemente, o aumento da produção de ROS. No complexo III, o estado sobre-reduzido da *pool* de ubiquinona pode levar à transferência directa de electrões para o oxigénio molecular, com formação de iões superóxido.

Em condições normais a produção de ROS nas células é reduzida, cerca de $240 \mu M s^{-1}$ de $O_2^{\bullet -}$ e uma concentração estável de $0,5 \mu M$ de H_2O_2 no cloroplasto. No entanto, a sua produção pode aumentar em condições que provoquem a quebra da homeostase celular ($240-720 \mu M s^{-1} O_2^{\bullet -}$ e cerca de $5-15 \mu M H_2O_2$) (Polle, 2001).

O aumento da produção de ROS em condições de stresse ambiental pode provocar danos nas células, resultantes da destruição oxidativa de vários componentes celulares. No entanto, o papel das ROS em condições de stresse abiótico tem sido foco de investigação nos últimos anos, na medida em que estes têm vindo a ser relacionados com mecanismos de aclimação ao stresse. (Dat *et al.* 2000). Pensa-se que as ROS actuem como sinalizadores que induzem a activação de mecanismos de defesa e de resposta ao stresse (Dat *et al.* 2000). Neste sentido, os ROS representam não só um indicador celular de condições de stresse mas contribuem também para a transdução de sinal nos mecanismos de resposta ao stresse como mensageiros secundários. (Mittler, 2002).

A toxicidade associada aos ROS em conjunto com o seu papel preponderante como sinalizadores moleculares, torna necessária a existência de pelo menos dois tipos de mecanismos que regulem a concentração intracelular de ROS: um que permita a modulação de pequenas concentrações de ROS para efeitos de sinalização molecular, e outro que possibilite a eliminação de excesso de ROS, principalmente em condições de stresse (Mittler, 2002).

2.1.2 Formação de ROS em consequência do stresse hídrico

Como foi referido, apesar de a formação de ROS ser um processo indissociável do metabolismo celular (Asada, 1992; Foyer *et al.* 1997), os danos oxidativos resultantes do desequilíbrio entre a formação e a remoção de ROS estão muitas vezes associados a situações de stresse, resultantes de factores bióticos e/ou abióticos externos que influenciam desfavoravelmente a planta (Taiz & Zeiger, 1992). Assim, a capacidade de evitar a acumulação excessiva de ROS na sequência de situações de stresse é tão importante como a sua eliminação efectiva (Mittler, 2002).

A formação e acumulação de ROS aumenta em resposta a condições de stresse abiótico, provocado por factores ambientais tais como temperatura, salinidade, secura, anoxia, presença de metais pesados, entre outros (Dat *et al.* 2000; Noctor & Foyer, 1998). De um modo geral, o défice hídrico (no solo e/ou na atmosfera), quando coincidente com temperatura e radiação elevadas, constitui o factor que mais afecta a sobrevivência da planta e a produtividade das culturas (Boyer, 1982 *em* Chaves *et al.* 2003). Neste sentido, é determinante a aquisição de mecanismos que permitam à planta suportar condições desfavoráveis e, deste modo, evitar a excessiva produção de ROS.

É possível distinguir algumas estratégias adoptadas pelas plantas para combater os efeitos indesejáveis provocados pelo stresse hídrico tais como a fuga ao stresse, a capacidade de evitar a desidratação e tolerância ao nível dos tecidos (Chaves *et al.* 2003).

Plantas que escapam ao stresse hídrico estão aptas a completar o seu ciclo de vida antes que este ocorra (Chaves *et al.* 2003; Ramanjulu & Bartels, 2002), maximizando os recursos disponíveis (Maroco *et al.* 2002).

A estratégia utilizada para evitar a desidratação dos tecidos envolve (i) a maximização de absorção de água e (ii) redução do seu consumo, através do investimento na formação de raízes (Jackson *et al.* 2000) e do fecho dos estomas, respectivamente (Chaves *et al.* 2003). A limitação da perda de água ao nível das folhas pode ainda estar associada à redução da intercepção da radiação solar, resultante do enrolamento, alteração do ângulo e/ou aumento da reflectância da folha (Chaves *et al.* 2003).

Os mecanismos associados à estratégia de tolerância podem envolver paredes celulares mais rígidas, células mais pequenas e a acumulação de solutos com propriedades protectoras das macromoléculas, bem como alterações a nível metabólico (induzidas ou constitutivas) que permitam a protecção dos danos causados pela desidratação e consequente stresse oxidativo (Chaves *et al.* 2003).

A diminuição de CO₂ intracelular após o fecho dos estomas na situação de stresse hídrico prolongado (Chaves *et al.* 2003) conduz ao aumento da formação de ROS ao nível do cloroplasto e, neste sentido, as plantas desenvolveram alterações fisiológicas que lhes permitem evitar os efeitos do excesso de ROS provocados pelo stresse hídrico, tais como (i) adaptações fisiológicas como os metabolismos C₄ e CAM e (ii) mecanismos moleculares que adaptem o aparelho fotossintético à qualidade e intensidade da luz recebida, ou que suprimam totalmente a fotossíntese (Mittler, 2002). De acordo com este autor, estes mecanismos permitem o equilíbrio entre a quantidade de luz absorvida e a disponibilidade de CO₂ e, consequentemente, podem evitar a sobre-redução do aparelho fotossintético e a transferência de electrões para o O₂ em detrimento do CO₂.

2.1.3 Mecanismos de eliminação do efeito nocivo das ROS

A actividade dos sistemas antioxidantes tem surgido também como parte integrante das estratégias de tolerância ao stresse hídrico (Lascano *et al.* 2001). Del Longo *et al.* (1993) e Pastori & Trippi (1993) reportaram menores danos oxidativos e actividades mais elevadas de enzimas antioxidantes em cultivares de milho e trigo tolerantes ao stresse hídrico comparativamente a cultivares susceptíveis.

As plantas possuem vários mecanismos antioxidantes, enzimáticos e não-enzimáticos, localizadas em diferentes compartimentos celulares, que actuam na interrupção dos processos de oxidação desencadeados pelos ROS.

Os mecanismos não enzimáticos englobam o ascorbato na forma reduzida (AsA), glutathione na forma reduzida (GSH), flavonóides, alcalóides, compostos fenólicos, aminoácidos não proteicos, tocoferóis e carotenóides (Gratão *et al.* 2005), entre outros compostos antioxidantes redutores capazes de sequestrar os ROS sem formação de novas espécies reactivas (Martins & Mourato, 2008). Nas plantas, o AsA constitui não só um dos principais antioxidantes não enzimáticos, como também é considerado o substrato mais importante para a redução do H_2O_2 (Noctor & Foyer, 1998). Existe nos cloroplastos geralmente em elevada concentração, pois é rapidamente utilizado na eliminação do $O_2^{\cdot -}$ que é produzido nesse compartimento celular (Mittler, 2002). A GSH constitui também um importante antioxidante nos mecanismos de defesa das plantas, para além do seu papel preponderante em diversas funções fisiológicas, como no metabolismo do enxofre (Noctor & Foyer, 1998).

Os mecanismos enzimáticos de eliminação de ROS abrangem um conjunto de enzimas antioxidantes, que catalisam reacções de formação/regeneração de moléculas para a sequestração dos ROS ou que estão envolvidos directamente na sua remoção (Martins & Mourato, 2008). Os principais grupos de enzimas antioxidantes incluem a superóxido-dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), a catalase (CAT, EC 1.11.1.), peroxidases como a guaiacol - peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) as enzimas e metabolitos do ciclo da glutathione-ascorbato, como a ascorbato-peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) e a glutathione-redutase (GR, EC 1.6.4.2) (Sofo *et al.*, 2005), representados na **Figura 2.2**. A polifenol oxidase (PPO, EC 1.30.3.1), responsável pela oxidação de substratos o-difenólicos a o-quinonas (Kwyabara & Kathol, 1999), localizada essencialmente no lúmen dos tilacóides, participa também nos mecanismos de defesa da planta, na medida em que está relacionada com o metabolismo dos fenóis, que possuem uma acção antioxidante não enzimática (Rice-Evans *et al.* 1997).

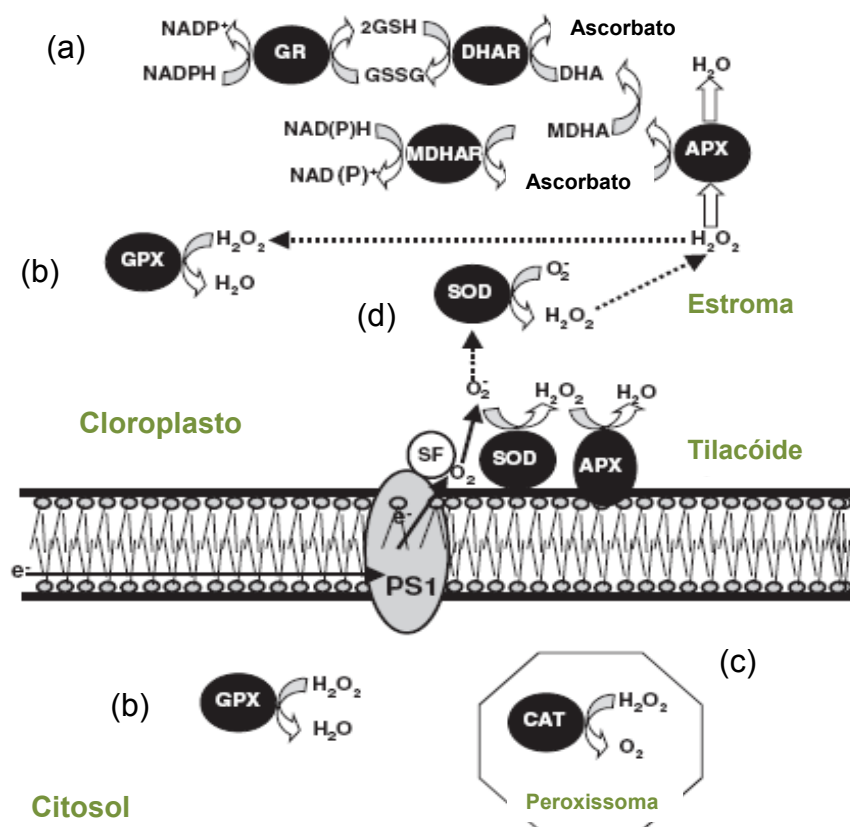
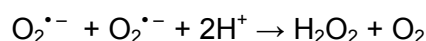


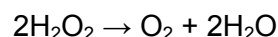
Figura 2.2 – Mecanismos enzimáticos de eliminação de ROS: (a) Ciclo da glutatona-ascorbato. (b) Ciclo da glutatona peroxidase (GPX). (c) Catalase (CAT). (d) Superoxido-dismutase (SOD). (Adaptado de Gratão *et al.* 2005).

A acção da SOD (**Figura 2.2 d**), uma metaloenzima, constitui a primeira via de defesa contra as ROS. (Gratão *et al.* 2005), na medida em que actua sobre o O₂^{•-} que é uma das primeiras ROS formadas e que é precursor de outras mais nocivas (Martins & Mourato, 2008). Está presente em quase todos os compartimentos celulares: cloroplastos, mitocôndrias, citosol, apoplasto e peroxissomas (Bowler *et al.* 1992) e catalisa a dismutação de duas moléculas de O₂^{•-} de acordo com a equação:



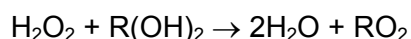
No entanto, a sua acção cria outro tipo de ROS, o peróxido de hidrogénio, que necessita de ser eliminado por outros mecanismos antioxidantes de defesa (Noctor & Foyer, 1998), como a CAT e as peroxidases (**Figura 2.2**).

A CAT (**Figura 2.2 c**) é uma enzima tetramérica, com um grupo heme, presente nos peroxissomas, glioxissomas e outros organelos onde existam enzimas que gerem H₂O₂, como a glicolato-oxidase (Dat *et al.* 2000). A sua actividade promove a eliminação de grandes quantidades de H₂O₂, ao catalisar a reacção:



A CAT apresenta níveis catalíticos bastante elevados, na ordem dos mM, o que sugere que a sua acção esteja relacionada com a eliminação de excesso de H₂O₂ acumulado em situações de stresse (Mittler, 2002). No entanto, possui baixa afinidade para o substrato na medida em que são necessárias duas moléculas de H₂O₂ para o centro activo da enzima (Willekens *et al.* 1995). Além disso, a ausência de CAT nos cloroplastos não permite a protecção dos grupos SH de enzimas do ciclo de Calvin do efeito destrutivo do H₂O₂ (Noctor & Foyer 1998).

As peroxidases constituem uma via alternativa à CAT na remoção de H₂O₂, uma vez que possuem maior afinidade para o substrato (Noctor & Foyer, 1998) e que estão presentes em quase todos os compartimentos celulares (Jiménez *et al.* 1997), sendo portanto mais eficientes na remoção do H₂O₂. A sua acção é dependente de um substrato como agente redutor para a conversão do H₂O₂ a H₂O, de acordo com a reacção genérica,



em que R(OH)₂ representa o substrato redutor utilizado e RO₂ representa a forma oxidada desse substrato.

As peroxidases variam consoante o substrato redutor que é utilizado. Assim, a glutathiona-peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) utiliza a glutathiona reduzida (GSH) (**Figura 2.2 b**), a guaiacol-peroxidase (POD) utiliza preferencialmente fenóis aromáticos, como o guaiacol, e a ascorbato-peroxidase (APX) utiliza como agente redutor o AsA (**Figura 2.2 a**), sendo esta última considerada dos mais eficazes mecanismos de remoção do H₂O₂. A POD e a APX possuem mecanismos de peroxidação semelhantes diferindo no substrato redutor utilizado embora a POD possa também oxidar o AsA, mas a taxas muito inferiores ao guaiacol (Asada, 1999), enquanto a APX possui alta afinidade para o AsA, sendo considerada muito específica para este substrato (Mehlhorn *et al.* 1995). Mittler (2002) sugere que a APX poderá ser responsável pelo controlo dos níveis de ROS para efeitos de sinalização

molecular uma vez que permite o controlo de pequenas quantidades de H_2O_2 , na ordem dos μM , e em localizações mais específicas do que a CAT, como referido anteriormente.

O AsA e a GSH podem actuar directamente na remoção do $\text{O}_2^{\cdot -}$ e do H_2O_2 , ou por via enzimática (Martins & Mourato, 2008), através do ciclo glutathiona-ascorbato (**Figura 2.2 a**). As enzimas e metabolitos da via da glutathiona-ascorbato actuam de forma integrada na redução do $\text{O}_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 em H_2O e actuam na regeneração do ascorbato e glutathiona (Martins & Mourato, 2008), participando numa transferência cíclica de equivalentes redutores, com electrões provenientes do NADPH (Noctor & Foyer, 1998).

O ciclo glutathiona-ascorbato envolve reacções sucessivas de oxidação e redução do AsA, GSH e NADPH pelas enzimas APX, GR, desidroascorbato-redutase (DHAR EC 1.8.5.1) e monodesidroascorbato-redutase (MDHAR, EC 1.6.5.4) (Gratão *et al.* 2005).

A APX utiliza duas moléculas de AsA para a redução do H_2O_2 a H_2O , com formação de duas moléculas de monodesidroascorbato (MDHA). Este radical pode ser directamente reduzido a ascorbato pela enzima MDHAR (monodesidroascorbato-redutase) utilizando o NADPH como poder redutor, ou sofrer uma dismutação e formar desidroascorbato (DHA). O DHA é reduzido a ascorbato pela acção da DHAR, que utiliza a glutathiona reduzida (GSH) como substrato redutor. Esta reacção origina glutathiona no estado oxidado (GSSG), que é novamente reduzida a GSH pelo NADPH, numa reacção catalisada pela enzima GR. A presença desta enzima, uma flavoproteína, nos cloroplastos garante níveis elevados de GSH, importante para a regeneração do AsA (Martins & Mourato, 2008), presente em elevada concentração nesse compartimento. Esta enzima participa também na regeneração da GSSG formada na redução do H_2O_2 a H_2O pela GPX, que utiliza a GSH como substrato redutor (Apel & Hirt, 2004). A implicação da GR nas reacções acima descritas atesta a sua importância nos mecanismos antioxidantes de defesa das plantas, a par com as enzimas directamente envolvidas na remoção de ROS, referidas anteriormente.

A presença do ciclo da glutathiona-ascorbato em quase todos os compartimentos celulares – cloroplastos, citosol, mitocôndrias, apoplasto e peroxissomas – bem como a elevada afinidade da enzima APX para o H_2O_2 indica que este ciclo desempenha um papel fundamental no controlo dos níveis de ROS nesses compartimentos (Mittler, 2002).

Admite-se que a manutenção de razões elevadas de AsA:MDHA e GSH:GSSG, pelo ciclo da glutathiona-ascorbato é essencial para a eliminação adequada de ROS nas células. Além disso, é também sugerido por Karpinski (1997) que as proporções entre as formas oxidadas e reduzidas dos diferentes antioxidantes poderão actuar como sinal para a modulação dos mecanismos de eliminação de ROS.

O aumento da actividade de enzimas antioxidantes e da concentração de compostos antioxidantes em condições de stresse hídrico é extremamente variável entre diferentes espécies de plantas, e mesmo entre cultivares da mesma espécie (Bartoli *et al.* 1999). A capacidade de eliminação de ROS tem sido relacionada com a capacidade de tolerância ao stresse. Desta forma, o aumento da expressão dos sistemas antioxidantes confere às plantas protecção contra o efeito adverso das ROS gerados em condições de stresse hídrico.

2.2 Relações hídricas da videira e evolução da maturação dos bagos

2.2.1 Ecofisiologia da videira em condições de déficit hídrico

A videira (*Vitis vinifera* L.) é uma espécie frequentemente sujeita a situações ambientais extremas nos climas em que se desenvolve tradicionalmente, como o clima Mediterrâneo. O déficit hídrico, aliado às altas temperaturas e irradiâncias atingidas durante a época estival, bem como um déficit de pressão de vapor elevado reduzem as trocas gasosas nas folhas e afectam negativamente a quantidade e a qualidade da produção. Na videira, tal como em muitas outras espécies, o fecho dos estomas é a primeira resposta da planta ao déficit hídrico, em condições de campo (Chaves *et al.* 2002). A combinação de irradiâncias elevadas com a diminuição de CO₂ resultante do fecho dos estomas induz na planta uma predisposição para a diminuição da fotossíntese ou mesmo para a fotoinibição. De facto, em condições limitantes da disponibilidade de CO₂ o poder redutor produzido pode ultrapassar as taxas a que este é utilizado pelo Ciclo de Calvin (Chaves & Oliveira, 2004). Maroco *et al.* (2002) refere que em videiras desenvolvidas em condições de campo a assimilação de CO₂ foi significativamente limitada devido ao fecho dos estomas com o aumento do déficit hídrico ao longo do Verão, havendo também uma redução proporcional na actividade de várias enzimas do Ciclo de Calvin. Assim, o declínio de CO₂ intracelular parece induzir na planta, a longo prazo, a diminuição dos processos fotossintéticos de modo a adaptar-se ao carbono disponível (Chaves *et al.* 2002). O fecho do estomas é também referido por Flexas *et al.* (1999) e Medrano *et al.* (2002) como a causa primária da diminuição da fotossíntese em videiras sujeitas a situações de stresse hídrico. No entanto, vários estudos demonstram que esta resposta ao nível dos estomas está mais relacionada com os teores de humidade do solo do que com o estado hídrico da folha, o que sugere que o fecho dos estomas possa ser induzido por sinalização de substâncias, como o ácido absísico (Chaves *et al.* 2002). Torna-se claro que na videira, bem como em muitas outras espécies, o fecho do estomas ocorre progressivamente com o avanço do déficit hídrico, o que apresenta consequências ao nível da fotossíntese, no entanto esta relação está dependente de outros factores, tais como a espécie, o historial hídrico dos indivíduos em estudo e as condições ambientais ocorridas no período de déficit hídrico (Flexas *et al.* 1999). Assim, em condições de campo a resposta da planta ao stresse hídrico pode ser fortemente alterada ou mesmo antagónica, devido à influência de outros tipos de stresse (Chaves *et al.* 2002).

A diminuição da fotossíntese que ocorre na videira em condições de défice hídrico pode ainda diminuir a produção e acumulação de hidratos de carbono e, consequentemente, afectar o seu crescimento e a sua produção (Souza, 2004). Recentemente, a prática da rega da vinha tem vindo a ser utilizada para minimizar os efeitos do stresse hídrico durante a época estival. Assim, o conhecimento do efeito de diferentes regimes hídricos sobre o comportamento da videira reveste-se da maior importância na avaliação e optimização destas práticas, tendo em conta a qualidade e a quantidade da produção.

2.2.2 A rega da vinha

Tradicionalmente, a vinha foi sempre uma cultura de sequeiro. A rega da vinha tem sido uma prática muito discutida por viticultores um pouco por todo o mundo. Se alguns duvidam das vantagens da sua aplicação, outros rendem-se às suas potencialidades no melhoramento da produção de uvas.

Regar a vinha é gerir o défice hídrico tolerado pelas plantas, de modo a manter os níveis de actividade fotossintética compatíveis com uma produção de qualidade (Pacheco *et al.* 2007). Em várias regiões do globo, incluindo Portugal, os viticultores utilizam a irrigação em períodos de seca, de forma a promover a estabilidade da produção e da sua qualidade (Souza, 2004). No entanto, a sua utilização não é desprovida de inconvenientes; o maior problema resultante desta prática prende-se com o excesso de vigor derivado do crescimento contínuo dos lançamentos, que tem repercussões ao nível da composição do fruto (McCarthy, 2002) e da sua qualidade fitossanitária. Assim, é necessário estabelecer o equilíbrio entre o crescimento vegetativo e reprodutivo da videira para tirar o máximo partido da prática da rega da vinha.

Tal como referido, na produção vegetal a água é um factor limitante das quantidades e da qualidade da produção conseguida. No entanto, é um recurso que deve ser bem gerido pois para além de ser escasso, o seu mau uso poderá implicar nos objectivos da produção. Existe uma clara pressão sobre os viticultores no sentido de aumentar a eficiência do uso da água, uma vez que as tradicionais práticas de regadio são actualmente insustentáveis (Souza, 2004).

2.2.2.1 Rega deficitária da vinha

Para fazer face à escassez de recursos hídricos, actuais e futuros, a rega deficitária, definida como a aplicação de água abaixo das necessidades totais da cultura (ET, Evapotranspiração), constitui um instrumento importante na redução do uso de água em culturas de regadio (Fereres & Soriano, 2006). Além do mais, vários estudos demonstram que a imposição de stress hídrico em algumas fases do desenvolvimento pode beneficiar o rendimento e a qualidade na produção vitícola (Fereres & Soriano, 2006). Recentemente têm sido desenvolvidas várias técnicas de rega da vinha que exploram o compromisso entre o equilíbrio do crescimento vegetativo e reprodutivo e a eficiência do uso da água. Um dos métodos que tem sido explorado neste sentido é a rega deficitária regulada (do inglês *RDI – Regulated Deficit Irrigation*). Inicialmente desenvolvida para pomares de prunóideas e pomóideas, foi adaptada com sucesso na produção de uvas para vinho (McCarthy, 2002). O conceito de RDI foi inicialmente proposto por Chalmers *et al.* (1981) e Mitchell & Chalmers (1982) para o controlo do crescimento vegetativo em pomares de pereiras, em que constataram que era possível reduzir a água de rega sem o risco de perdas de produção. Adicionalmente, existem já vários estudos que demonstram que a disponibilização do total da ET na cultura da vinha poderá não ser a melhor estratégia de rega em determinadas situações (Fereres & Evans, 2006).

O fundamento primário da RDI assenta na redução ou interrupção do fornecimento de água à cultura no período em que o crescimento vegetativo é elevado e o crescimento do fruto é reduzido (Souza, 2004). Na produção de uvas para vinho, é recomendado que o défice hídrico seja limitado ao período após o vingamento do fruto. No entanto, o défice hídrico deve ser evitado durante o período de maturação dos bagos, de modo a assegurar que não ocorra competição entre os bagos em maturação e o crescimento vegetativo (McCarthy, 2002). Esta prática tem resultado em melhorias significativas na qualidade dos vinhos tintos, embora por vezes se verifique uma quebra na produção devido à redução do tamanho dos bagos (Dry *et al.* 2001)

2.2.3 Desenvolvimento dos bagos

A maturação dos bagos é um processo que ocorre ao longo do tempo, em que se verificam múltiplas alterações de ordem fisiológica e estrutural. O desenvolvimento dos bagos começa com a polinização e prossegue até ao estado de maturação ou, eventualmente, de sobrematuração. Traduz-se por um crescimento em volume dos bagos acompanhando uma evolução de caracteres físicos (cor e firmeza) e da composição química das uvas (açúcares, ácidos e compostos fenólicos) (Reynier, 1986; Ribéreau-Gayon *et al.* 2006). Ao longo do desenvolvimento distinguem-se geralmente três períodos:

- *período herbáceo*, durante o qual o bago, verde e rijo, aumenta de volume e se comporta como um órgão clorofilino em crescimento;
- *período de maturação*, no qual o bago muda de cor (castas tintas), aumenta de novo e se comporta como um órgão de maturação e, sobretudo, de armazenamento de fotoassimilados. Começa por um período de evolução rápida das características físicas e bioquímicas da uva, o amadurecimento, e termina no estado de maturação;
- *período de sobrematuração*, durante o qual a uva emurchece enquanto a sua composição química evolui.

O crescimento do bago efectua-se de acordo com a curva sigmoidal dupla característica dos frutos não climatérico. O aumento de volume dos bagos, desde o vingamento até à maturação, efectua-se em três fases (Negri *et al.* 2008; Reynier, 1986; Ribéreau-Gayon *et al.* 2006):

- *fase I* (crescimento rápido), com a duração de cinco a sete semanas, em que se verifica primeiramente a proliferação e crescimento celular, seguida de unicamente por crescimento celular. Nesta fase ocorre uma intensa actividade metabólica nos bagos, caracterizada por uma elevada intensidade respiratória e pela acumulação de solutos, como o ácido málico, ácido tartárico e taninos. Durante este período a clorofila é o pigmento predominante;
- *fase II* (crescimento lento), que pode durar desde alguns dias até quatro semanas, dependendo da precocidade da casta. É uma fase de transição, durante a qual não ocorrem modificações significativas no peso e volume do bago. O final desta fase

coincide com o início da maturação, que é visível pela alteração da cor do bago, em castas tintas, devida ao início da síntese de antocianinas na película, que corresponde à fase do pintor;

- *fase III* (crescimento rápido), durante a qual o crescimento acompanha a maturação. Nesta fase, o aumento de peso do bago deve-se essencialmente à acumulação de água e açúcares e o aumento de volume é devido ao crescimento celular.

O período de maturação manifesta-se por uma modificação física e bioquímica da uva. Nesta fase, o bago perde a sua coloração verde, torna-se colorido e amolece. A composição do bago começa por mudar bruscamente no início do período e, em seguida, vai-se alterando de forma gradual. A concentração de ácido málico diminui enquanto os teores de açúcar (glucose e frutose), compostos aromáticos voláteis e antocianinas aumentam (Negri *et al.* 2008).

Em todas as fases de crescimento, o elevado metabolismo da película influi activamente nas características finais do bago.

2.2.4 Constituição da película

A película representa cerca de 5-10 % (p/p) do peso seco total do bago, e actua como uma barreira hidrofóbica de protecção contra danos mecânicos, desidratação, infecções fúngicas e radiação UV. A película forma uma região heterogénea (**Figura 2.3**) que pode ser dividida em três camadas distintas: (1) a camada exterior, a cutícula, formada por ácidos gordos hidroxilados que compõem a cutina, e coberta por ceras hidrofóbicas; (2) a epiderme intermédia, composta por uma ou duas camadas de células mais ou menos compactadas, dependendo da cultivar; e (3) a camada interna, a hipoderme, constituída por várias camadas de células que contém a maior parte dos compostos fenólicos presentes na película (Lecas & Brillouet, 1994; Ribéreau-Gayon *et al.* 2006)

A parede celular da película dos bagos possui na sua constituição cerca de 30 % (p/p) de polissacáridos neutros (celulose, xiloglucanas, arabinanas, galactanas, xilanas e mananas), 20 % (p/p) de substâncias pécticas, 15 % (p/p) de proantocianidinas insolúveis e <5 % (p/p) de proteínas estruturais (Lecas & Brillouet, 1994).

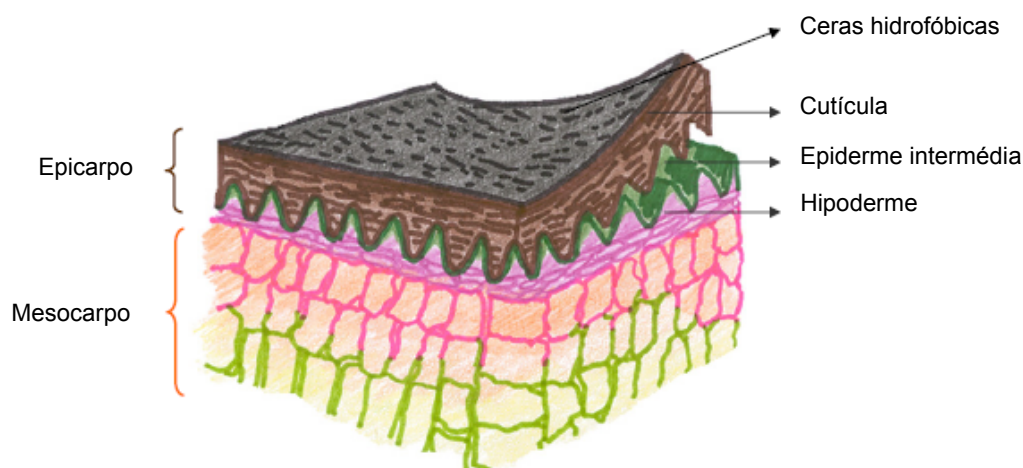


Figura 2.3 – Diferentes camadas constituintes da película do bago (Adaptado de Pinelo *et al.* 2006)

As substâncias fenólicas presentes na película podem estar associados aos polissacáridos da parede celular, ou independentes destes, no vacúolo e no núcleo das células. De acordo com as suas características, podem ser classificados em três grupos: (1) ácidos fenólicos (principalmente ácido benzóico e hidroxicinâmico, (2) flavonóides simples (catequinas, flavonóis e antocianinas) e (3) taninos e proantocianidinas (Pinelo *et al.* 2006).

Durante a maturação, os compostos fenólicos com maior relevância são as antocianinas e os taninos. A sua evolução durante a maturação é um dos factores determinantes da qualidade das uvas. Na película, as antocianinas surgem no início da maturação (ou pintor), e a sua concentração aumenta em seguida de forma mais ou menos regular e diminuindo com a aproximação do final da maturação. Simultaneamente, aumenta também a concentração em taninos (Reynier, 1986).

A composição da película procede não só das características genéticas da casta como também das condições ambientais em que os bagos são produzidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal e Condições Experimentais

Neste trabalho foram utilizadas plantas de *Vitis vinifera* L. da casta Trincadeira, existentes numa vinha com 6 anos, instaladas em Estremoz (Monte dos Seis Reis), numa zona caracterizada por clima Mediterrânico, que foram submetidas a 3 regimes hídricos distintos:

- **FI (*Full Irrigated*)**, em que o fornecimento de água à cultura foi equivalente a 100% da Evapotranspiração cultural (ETc), aplicada em ambos os lados da raiz (50% de cada lado).
- **RDI (*Regulated Deficit Irrigated*)**, em que 50% da Etc foi suprida apenas em algumas fases de desenvolvimento da videira.
- **NI (*Non Irrigated*)**, em que o fornecimento de água esteve apenas dependente da precipitação ocorrida durante o ciclo vegetativo.

A fertilização efectuada foi a adequada ao tipo de cultura e ao tipo de solo.

Foram recolhidas amostras compostas de bagos de cada um dos regimes hídricos em diferentes estados de desenvolvimento do bago:

Tabela 3.1 – Data de recolha e estado fenológico das amostras testadas

Desenvolvimento do bago	Data de Recolha	Amostra
Bago Verde	11/07/2007	T1
Pintor	30/07/2007	T2
Estado de maturação 1	06/08/2007	T3
Estado de maturação 2	13/08/2007	T4
Estado de maturação 3	20/08/2007	T5

As amostras colhidas foram imediatamente congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C.

A cada estado de desenvolvimento do bago corresponde um determinado teor de ácidos e açúcares, dados pelo °Brix e pela acidez titulável, para cada um dos regimes hídricos. A caracterização dos diferentes estados de maturação do bago apresenta-se em anexo.

Não foi possível a obtenção de amostras do ponto T3 para o regime FI e do ponto T5 para o regime RDI.

3.2 Extracção enzimática

Na obtenção de extractos para a determinação da actividade enzimática das enzimas POD, PPO, CAT e GR utilizaram-se 2,0 g de película de bagos congelados a -80°C. O material vegetal foi posteriormente macerado num almofariz com azoto líquido, na presença de 20% (p/p) de PVPP, até se obter um pó muito fino, ao qual se adicionou 4 mL de tampão de extracção, constituído por: 100 mM de Fosfato de Sódio, 200 mM de Cloreto de Potássio, 1 mM de EDTA, 3 mM de DTT e 2 % (v/v) de Triton X-100, a pH 7,8. Procedimento semelhante foi levado a cabo para a obtenção do extracto para a determinação da actividade da enzima APX, apenas se acrescentando 10 mM de ascorbato ao tampão de extracção acima descrito.

Os extractos foram depois submetidos a centrifugação a 12 000 x g, durante 20 minutos à temperatura de 4 °C, sendo o sobrenadante recolhido e filtrado em filtros descartáveis com membranas de 0,45 micron, para a obtenção de extractos límpidos. Os extractos obtidos desta forma foram utilizados para a determinação das actividades enzimáticas e concentração de proteína solúvel.

3.3 Determinação da actividade enzimática

A quantidade de enzima presente numa amostra é estimada pela sua actividade enzimática, isto é, pela quantidade de produto formado por unidade de tempo, em condições bem definidas, o que se deve ao facto de a velocidade das reacções catalisadas por enzimas ser directamente proporcional à quantidade de enzima existente. Para cada um dos métodos enzimáticos utilizados foi definida a actividade enzimática expressa em unidades internacionais U ($\mu\text{mol min}^{-1}$), ou unidade de enzima. Uma unidade de actividade enzimática é definida pela quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μmole de substrato

por minuto, a 25°C, em condições de pH e concentração de substrato bem definidas e próximas de valores óptimos (Ricardo & Teixeira, 1979).

Neste trabalho a actividade enzimática foi expressa em $\text{U mL}^{-1} \text{g}^{-1}$, unidade de actividade enzimática relacionada com o peso fresco da amostra.

As determinações da actividade enzimática de POD, PPO, CAT, GR e APX em película de bagos de Trincadeira foram realizadas num espectrofotómetro com registador computadorizado (Hitachi U-2000 UV/Vis Spectrophotometer), através de um método contínuo de medição da velocidade da reacção em função do tempo. Este equipamento mede a variação de absorvância para um determinado comprimento de onda após a inserção da cuvete contendo uma solução com a enzima e o respectivo meio reaccional, e efectua o cálculo estatístico da melhor estimativa para as velocidades iniciais, a partir das taxas de variação de absorvância em contínuo, durante 2 minutos, com leituras efectuadas de 10 em 10 segundos.

Na determinação da actividade das diferentes enzimas foram realizadas três repetições para todas as amostras em estudo.

3.3.1 Medição da actividade enzimática da guaiacol-peroxidase (POD)

A determinação da actividade da enzima POD foi efectuada por adaptação do método descrito em Tang & Newton (2005). Este método baseia-se na velocidade de formação de tetraguaiacol, um produto corado, por oxidação do guaiacol, na presença de um agente oxidante, o H_2O_2 . A actividade enzimática é definida pela utilização de 1 μmol de guaiacol por minuto e por mL ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$) à temperatura ambiente, nas condições do ensaio.

A actividade enzimática da POD foi determinada num meio reaccional contendo 30 mM de guaiacol e 25 μL de extracto, em tampão acetato de sódio 0,2 M a pH 6,0. A reacção foi iniciada com a adição de 4 mM de H_2O_2 . As leituras no espectrofotómetro mediram a taxa inicial do aumento da absorvância, a 470 nm, resultante da formação de tetraguaiacol, durante 2 minutos. Na apresentação dos resultados, a actividade enzimática é expressa em $\text{U mL}^{-1} \text{g}^{-1}$, usando um $\varepsilon = 2,55 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{mm}^{-1}$ (Tang & Newton, 2005).

3.3.2 Medição da actividade enzimática da polifenoloxidase (PPO)

A determinação da actividade da enzima PPO foi efectuada com base no método descrito em Oktay *et al.* (1995), baseado na reacção geral da enzima, que utiliza o catecol como substrato para a formação de benzoquinonas. A actividade enzimática é definida pela quantidade de enzima que causa um aumento de absorvância de 1 min^{-1} , devido à oxidação do catecol, à temperatura ambiente, nas condições do ensaio.

A actividade enzimática da PPO foi determinada a pH 7,0 na presença de tampão fosfato 50 mM e 100 μL de extracto. A reacção foi iniciada com a adição de 5 mM de catecol. As leituras no espectrofotómetro mediram a taxa inicial do aumento de absorvância a 420 nm como resultado da formação de benzoquinonas, durante 2 minutos. Os resultados foram expressos em $\text{U mL}^{-1} \text{ g}^{-1}$, tendo em conta que U se refere, neste caso e para maior simplificação da apresentação dos resultados, à variação de absorvância por minuto.

3.3.3 Medição da actividade enzimática da catalase (CAT)

A determinação da actividade da enzima CAT foi efectuada com base no método descrito por Aebi (1983) referido em Bergmeyer (1983). A actividade enzimática é definida pela quantidade de enzima necessária para catalisar a decomposição de 1 μmol de H_2O_2 por minuto, à temperatura ambiente, nas condições do ensaio.

O ensaio foi realizado a pH 7,6 na presença de tampão fosfato 50 mM e 100 μL de extracto. A reacção foi iniciada com a adição de 0,1 mM de H_2O_2 . As leituras foram efectuadas em cuvetes de quartzo, contra um ensaio em branco para cada volume de amostra. A actividade enzimática foi determinada a partir da decomposição do H_2O_2 a 240 nm durante 2 minutos, usando um $\epsilon = 3,94 \times 10^{-3} \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$ (Aebi, 1983).

3.3.4 Medição da actividade enzimática da glutathiona-redutase (GR)

A determinação da actividade da enzima GR foi efectuada por adaptação do método descrito em Shanker *et al.* (2004), baseada no aumento da absorvância resultante da redução do 5.5' – ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) pela GSH. A actividade enzimática é definida pela quantidade de enzima que reduz 1 mmol de GSSG por hora à temperatura ambiente.

A actividade enzimática da GR foi determinada num meio reaccional contendo 0,75 mM de DTNB, 0,1 mM de NADPH, 250 μ L de água desionizada e 50 μ L de extracto, em tampão fosfato de potássio 0,1 M contendo 1 mM de EDTA, a pH 7,5. A reacção foi iniciada com a adição de GSSG 1 mM. As leituras no espectrofotómetro mediram a taxa inicial do aumento da absorvância, a 412 nm, resultante da redução do DTNB, durante 2 minutos. Os resultados foram expressos em U mL⁻¹ g⁻¹ peso fresco,, usando um ϵ = 6.2 mM⁻¹ cm⁻¹ (Demiral & Turkan, 2005).

3.3.5 Medição da actividade da enzima ascorbato-peroxidase (APX)

A determinação da actividade da enzima APX foi efectuada por adaptação do método descrito por Ali *et al.* (2005), com base na oxidação do ascorbato na reacção geral da actividade peroxidásica da enzima. A actividade enzimática é definida pela oxidação de 1 μ mol de ascorbato por minuto e por mL, à temperatura ambiente.

A actividade enzimática da APX foi determinada num meio reaccional contendo 0,25 mM ascorbato, 0,1 mM EDTA e 50 μ L de extracto, em tampão fosfato 50 mM a pH 7,5. A reacção foi iniciada com a adição de 0,30 mM de H₂O₂. A actividade enzimática foi estabelecida com base na diminuição de absorvância, a 290 nm, provocada pela oxidação do ascorbato, durante 2 minutos, usando um ϵ = 0,28 mL μ mol⁻¹ mm⁻¹.

3.4 Quantificação da proteína solúvel

A concentração de proteína solúvel existente no material vegetal analisado foi determinada pelo método de Bradford (1979), modificado, que se baseia na absorvância a 595 nm de uma solução ácida de Azul de Comassie Brilhante G-250. Utilizou-se como padrão uma solução de albumina bovina (Sigma) com a qual se obteve a curva padrão numa gama de concentração entre 0 e 1 mg mL⁻¹. A amostra utilizada foi obtida através do método de extracção descrito em 3.2. Adicionou-se 30 μ L de extracto a 6 mL de solução de Azul de Comassie Brilhante G-250 e agitou-se em vortex. As leituras foram efectuadas no espectrofotómetro, a 595 nm, contra um ensaio em branco contendo 30 μ L de tampão de extracção (descrito em 3.2) e 3 mL da mesma solução de Azul de Comassie. A concentração de proteína determinou-se por interpolação na curva padrão dos valores de absorvância obtidos. Todas as amostras foram efectuadas em triplicado.

3.5 Tratamento estatístico dos dados

O tratamento estatístico foi realizado com o auxílio do programa de estatística SPSS 13.0. Os dados referentes aos três regimes hídricos estudados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) ($\alpha = 0,05$). Nos casos em que se obteve um F significativo ($P < 0,05$), a significância existente entre médias foi avaliada pelo teste de Tuckey.

4. OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRACÇÃO

4.1 Considerações gerais

A grande diversidade de materiais biológicos torna difícil o estabelecimento de condições e de métodos óptimos para a extracção enzimática. A pesquisa de métodos de extracção enzimática adaptados a película de bagos de uva revelou que esta não tem sido uma área em foco na investigação ao longo dos anos. Neste ensaio o principal problema surgiu na extracção da fracção proteica das amostras. Os extractos obtidos a partir de métodos de extracção já comprovados em diversos materiais vegetais não revelaram indícios de actividade para as enzimas em estudo. Tal facto levantou dúvidas sobre a capacidade de extracção proteica desses métodos inicialmente utilizados, uma vez que não estava em causa a presença das enzimas em estudo, que se encontram naturalmente presentes nas células vegetais.

Assim, foi necessário proceder-se à optimização e modificação dos métodos de extracção disponíveis para se poder efectuar a medição da actividade das diferentes enzimas em estudo. Com este objectivo, foram testados vários procedimentos experimentais para as diferentes etapas do processo de extracção, cuja adaptação ao material vegetal foi sequencial até ser possível obter uma extracção representativa da fracção proteica.

4.2 Procedimento Experimental 1

A composição do tampão de extracção é determinante para a estabilidade dos extractos obtidos, pelo que é frequente a utilização de substâncias protectoras, que permitem evitar perdas de actividade enzimática devido à oxidação de grupos tiol ou à presença de compostos fenólicos, metais pesados, entre outros (Price, 1992).

A oxidação dos grupos tiol pode ser evitada com a adição de compostos redutores como o ditrioteitol (DTT) no tampão de extracção. A adição de agentes quelantes, como o EDTA, elimina quantidades vestigiais de metais pesados e contribui para a estabilização das enzimas solubilizadas. Este composto tem ainda um efeito estabilizador nas soluções de DTT (Price, 1992). A utilização de polivinil(polipirrolidona), PVPP, durante a maceração do material vegetal permite a adsorção de compostos fenólicos, reduzindo as interferências associadas à sua presença.

As proteínas membranares são geralmente lábeis e requerem um meio hidrofóbico. A polaridade pode ser diminuída por adição de sacarose aos tampões. Pelo contrário, outras proteínas requerem um meio polar de força iónica adequada, ou que se consegue pela adição de cloreto de sódio ou de cloreto de potássio aos tampões.

Durante a extracção podem surgir alterações do pH, devidas à libertação de conteúdo intracelular ou a processos metabólicos. Em todos os passos do processo de extracção o pH deve ser controlado para evitar a desnaturação e inactivação enzimáticas.

A temperatura de 4°C é geralmente utilizada durante os processos de extracção enzimática, visto que minimiza a desnaturação e a proteólise.

Com base neste conhecimento, numa primeira fase, foi testada a extracção da fracção proteica existente em 1g de película, com maceração em almofariz previamente arrefecido em congelador, ao qual se adicionou areia, 2% PVPP (p/p) e 2 mL de tampão de extracção. Foram testados cinco tampões de extracção para a obtenção dos extractos:

Tabela 4.1 – Constituição dos tampões de extracção testados no Procedimento Experimental 1

<i>Tampão</i>	<i>Tris-</i>							
	<i>pH</i>	<i>HCl (mM)</i>	<i>Na₂HPO₄ (mM)</i>	<i>DTT (mM)</i>	<i>EDTA (mM)</i>	<i>Sacarose (mM)</i>	<i>KCl (M)</i>	<i>NaCl (M)</i>
(1)	7,5	100	-	3	1	-	-	-
(2)	7,5	-	-	5	1	400	-	-
(3)	7,0	100	-	1	1	-	-	-
(4)	7,0	100	-	1	1	-	-	1
(5)	6,2	-	100	3	1	-	1	-

Os extractos foram centrifugados (12000 x *g* durante 20 minutos à temperatura de 4°C) e o sobrenadante utilizado para a determinação das actividades enzimáticas. Em todas as situações testadas, a amostra obtida apresentou uma tonalidade vermelho escuro, devido à grande quantidade substâncias de fenólicas que estão naturalmente presentes na película de bagos em estado de maturação mais avançada (Pinelo *et al.* 2006), o que levou a crer que a quantidade de PVPP utilizada poderia ser insuficiente.

Todas as combinações utilizadas na constituição do tampão de extracção, resultaram de métodos referidos em diversa bibliografia, com aplicação em diferentes materiais vegetais, combinando a acção de diversos factores que influenciam a solubilidade das proteínas; foram estes o pH, a força iónica através da utilização de NaCl e KCl, ou ainda de protectores osmóticos como a sacarose.

Com este procedimento e utilizando estas diferentes composições de tampão de extracção não foi detectada a actividade de nenhuma das enzimas em estudo. Dada a enorme variedade de substâncias fenólicas que caracterizam este material vegetal, foi posta a hipótese de haver interferência destas com a fracção proteica, o que conduziu à necessidade de recorrer a outros processos de extracção, que permitissem uma remoção mais eficaz dos compostos fenólicos e desta forma reduzir a sua interferência no extracto.

4.3 Procedimento Experimental 2

Os métodos de fraccionamento utilizados na purificação de proteínas actuam em solução e exploram diferenças na solubilidade, na carga, na massa molecular, na hidrofobicidade, e na capacidade das proteínas reconhecerem ligandos específicos e e formarem ligações covalentes.

O fraccionamento com solventes orgânicos é um método vulgarmente utilizado na extracção enzimática, em diversos materiais vegetais. Os solventes mais utilizados são o etanol, o metanol e a acetona. Este método permite a separação da fracção proteica por precipitação por solventes, sem no entanto haver desnaturação e perda da actividade biológica da maior parte das proteínas. (Lester *et al.* 2004) A utilização de solventes orgânicos é referida por Pinelo *et al.* (2006) como o método que apresenta melhores resultados na extracção de fenóis da película de uva.

Como tal, foi realizada uma extracção com solventes orgânicos na tentativa de remover o excesso de compostos fenólicos presentes no extracto e precipitar a proteína presente na amostra. O solvente utilizado foi a acetona a -20 °C, que causa menor desnaturação das proteínas, e por ser mais volátil que outros solventes utilizados, a sua remoção é mais fácil a pressão reduzida.

Foi separado \approx 1g de película e macerado em almofariz arrefecido em congelador, ao qual se adicionou cerca de 5 mL de acetona. O extracto foi de seguida lavado com acetona em funil de Buchner e o precipitado recolhido do papel de filtro. O precipitado obtido foi suspenso em 2 mL de tampão de extracção (1) e centrifugado (12000 x *g* durante 20 minutos à temperatura de 4 °C) e o sobrenadante utilizado para a determinação das actividades enzimáticas. O material resultante, designado vulgarmente por pó cetónico, deu origem a extractos que apresentaram uma cor rosácea, o que indica que os fenóis não foram totalmente removidos na extracção com a acetona. Contudo, mesmo com este processo não foi detectada actividade de nenhuma das enzimas em estudo, o que

pressupunha que este método não estaria a extrair as enzimas da película, apesar de se ter revelado mais eficaz na remoção dos fenóis que o método descrito em 4.2. Além disso, este resultado foi bastante inesperado, pois esta metodologia é muito aconselhada para a obtenção de extractos de origem vegetal para a determinação de actividade de diversas enzimas (Lester *et al.* 2004), uma vez que permite a remoção de diversos interferentes, obtendo-se elevadas percentagens de recuperação da fracção proteica, e consequentemente, níveis de actividade enzimática mais elevados.

4.4 Procedimento Experimental 3

Outra tentativa de extracção da fracção proteica, foi recorrendo ao fraccionamento com sulfato de amónio. Este processo recorre à precipitação das proteínas pelo sulfato de amónio, que tem uma acção estabilizadora de proteínas, minimizando os riscos de desnaturação e proteólise quando utilizado a concentrações elevadas, não se conhecendo praticamente nenhum inconveniente da sua utilização, mesmo no fraccionamento de proteínas e enzimas extremamente lábeis. Geralmente, a quantidade de sulfato de amónio adicionado exprime-se em percentagem de saturação, e pode ser consultado em tabelas ou determinada pela quantidade de sulfato de amónio a adicionar a um litro de solução a 20°C. A utilização de sulfato de amónio como método de fraccionamento conduz geralmente a perdas acentuadas, pelo que a sua utilização deve ser ponderada consoante o material vegetal e o passo do processo de extracção em que é aplicado.

Foi separado \approx 1g de película e macerado em almofariz previamente arrefecido em congelador, ao qual se adicionou 3 mL de tampão de extracção (1). Os extractos foram centrifugados ($12000 \times g$ durante 20 minutos à temperatura de 4°C) e com o sobrenadante foi efectuada uma precipitação da proteína com sulfato de amónio até 90% (p/v). O precipitado obtido foi suspenso em 500 μ L de tampão de extracção (1). O extracto recolhido foi utilizado para a determinação das actividades enzimáticas.

A precipitação com sulfato de amónio até 90 % (p/v) originou muito pouco precipitado, o que leva a crer que existia muito pouca proteína no extracto. Também neste caso, não foi detectada actividade enzimática para nenhuma das enzimas testadas o que, em conjunto com as perdas ocorridas no processo, afastou este método do trabalho experimental.

4.5 Procedimento Experimental 4

Os resultados obtidos nas diversas tentativas de extracção enzimática na película levaram a novas tentativas com diferentes materiais vegetais (bago inteiro e folhas), repetindo os métodos anteriormente descritos, e com diferentes concentrações de extracto. Contudo também estas se revelaram infrutíferas na detecção de actividade das enzimas em estudo.

Em todos os procedimentos realizados, descritos anteriormente, se verificou não existir actividade enzimática, tal como esperado. Por outro lado, os extractos revelaram níveis de proteína muito baixos, nomeadamente nos resultados obtidos em 4.4, o que levantou a hipótese de o tampão de extracção não ser eficaz para remoção da fracção proteica do material vegetal. De facto, e apesar de aparentemente, todas as condições de solubilização da fracção proteica estivessem a ser respeitados, haveria uma deficiente recuperação da proteína, que estaria a ser desprezada no resíduo insolúvel resultante da centrifugação, por existirem ligações fortes aos compostos componentes dos materiais estruturais da película.

Assim, foi então testada a adição de um detergente ao tampão de extracção, Triton X-100, que se revelou muito eficaz na remoção da fracção proteica da película,, fundamental para a determinação das actividades enzimáticas. Este procedimento possibilitou a extracção das enzimas em estudo, bem como uma elevada estabilidade dos extractos, o que permitiu a realização deste trabalho.

Este resultado pode ser bem justificado com a natureza das enzimas em estudo. As peroxidases, bem como a PPO (Amiot *et al.* 1997) são enzimas que se encontram geralmente associadas a membranas, pelo que a utilização de um detergente permite a quebra da estrutura membranar (Price, 1992) e, consequentemente, a libertação das enzimas associadas. O uso de detergente aniónicos como o SDS (dodecil-sulfato de sódio) pode causar a desnaturação de enzimas e, portanto, perda de actividade enzimática. Pelo contrário, detergentes não iónicos, como o Triton X-100, são geralmente muito bem tolerados até 2-3% (v/v).

O aumento da quantidade de PVPP para 20% (p/p) durante a maceração permitiu a remoção de grande parte dos fenóis presentes minimizando assim a sua interferência nos extractos.

A possibilidade de realizar a extracção na presença de azoto líquido garantiu a manutenção de baixas temperaturas durante todo o processo, o que constitui indiscutivelmente uma condição necessária a todos os processos de extracção, minimizando os riscos de desnaturação de enzimas e evitando a actividade indesejável de proteases presentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram que a evolução da maturação provocou, ao longo do tempo, flutuações irregulares na actividade das enzimas em estudo, para os três regimes hídricos. Apesar da variabilidade existente, que se atribui ao facto de ser um ensaio de campo em que é muito difícil controlar todas as variáveis, é possível tirar algumas conclusões sobre a influência do regime hídrico nas condições de stress que induz nas plantas e na resposta obtida. De salientar que o material biológico em estudo neste trabalho é a película do bago, pelo que os resultados obtidos reflectem as alterações dos níveis enzimáticos que se verificam apenas nesse material estrutural, que por sua vez está muito dependente de um enorme número de factores que influenciam o seu desenvolvimento. Os diversos resultados apresentados na bibliografia sobre os mecanismos antioxidantes de defesa da planta referem-se a processos que ocorrem geralmente ao nível da folha, que não poderão ser assumidos paralelamente para a película. Assim, a análise efectuada ao nível da película representa uma tentativa de aproximação ao comportamento dos mecanismos antioxidantes enzimáticos neste material, com base nos processos já descritos para folhas. A análise dos resultados obtidos será efectuada nos pontos seguintes.

5.1 Guaiacol-peroxidase (POD)

A actividade da enzima revelou uma evolução diferente ao longo do tempo, para cada um dos regimes hídricos em estudo (**Figura 5.1**). No regime hídrico NI (**Figura 5.1 a**), a actividade da enzima manteve-se estável até ao ponto T3, com valores de actividade próximos de $0,40 \text{ U mL}^{-1} \text{ g}^{-1}$, observando-se um acréscimo significativo em T4, onde atingiu o valor máximo de actividade registado para os três regimes hídricos. Verificou-se depois um decréscimo no ponto T5, mantendo-se, contudo, significativamente mais elevado do que nos pontos iniciais. Apesar da diferença significativa registada entre os pontos T4 e T5, é de admitir que esses níveis mais elevados de actividade da POD possam estar relacionados com a maturação, e portanto, verificar-se uma tendência de aumento da actividade desta enzima ao longo do tempo de maturação, e portanto com maior expressão nos pontos de maturação mais avançada.

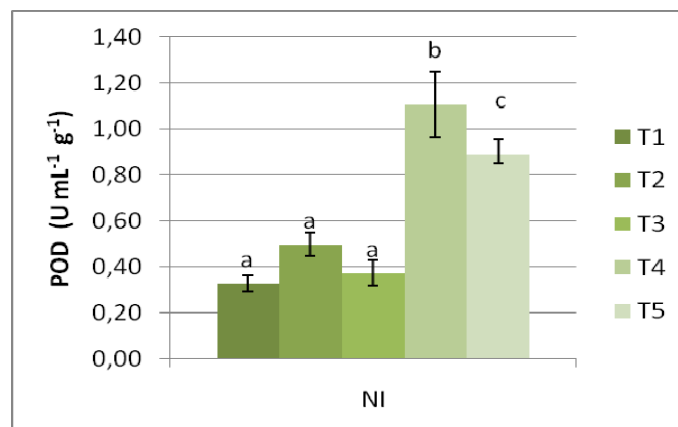
A actividade desta enzima está frequentemente associada à resposta das plantas a condições de stresse, neste caso como consequência do stresse hídrico pode haver um aumento da formação de ROS, nomeadamente do H_2O_2 , dado que esta enzima actua directamente na eliminação deste composto. De facto, é na fase final da maturação que

normalmente se atingem temperaturas mais elevadas o que poderá levar a maiores carências de água em plantas submetidas a este regime hídrico. Assim, para os estados de maturação mais avançada, em que os níveis de stress poderão ser mais importantes, admite-se que a POD possa ser uma das formas de resposta das células no controlo dos níveis de H_2O_2 formados, tal como acontece em outras condições que podem gerar stresse oxidativo e consequente aumento de ROS.

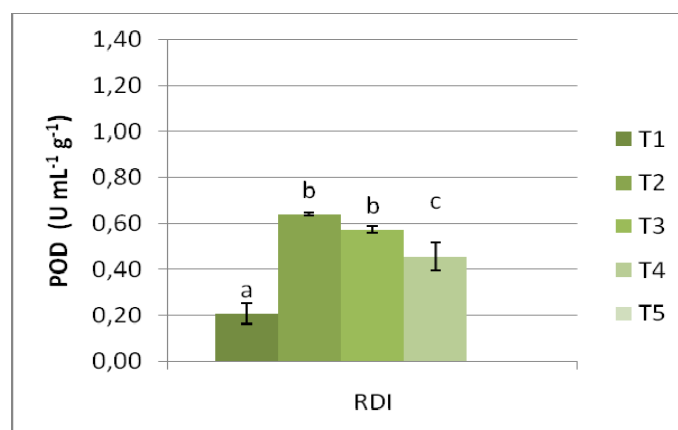
No regime hídrico RDI (**Figura 5.1 b**), registaram-se os valores mais baixos de actividade no ponto T1. A partir do ponto T2 observou-se um aumento significativo, que se manteve em T3, verificando depois um ligeiro decréscimo em T4. A falta de valores comparativos em T5 impossibilitou novamente uma análise concisa da variação da actividade da enzima ao longo do tempo.

Relativamente a FI (**Figura 5.1 c**), a actividade da enzima manteve-se constante em todos os pontos analisados, com excepção do ponto T2 onde se observou um aumento significativo de actividade. A ausência de dados para o ponto T3 impossibilitou uma análise concreta da variação da actividade da enzima ao longo do tempo. As flutuações observadas nos três regimes hídricos não permitiram que se fizesse uma aproximação ao valor de actividade neste ponto. O aumento verificado no ponto T2, comum a RDI e FI, parece indicar que em circunstâncias hídricas favoráveis ocorre um aumento da produção de ROS, neste caso de H_2O_2 , na fase do *pintor* que induz os mecanismos de resposta da planta ao stresse oxidativo com o aumento dos níveis de POD. Este resultado está de acordo com os trabalhos de Pilati *et al.* (2007) em que foi reportado um incremento súbito de processos oxidativos na fase do pintor. De facto, o pintor é uma fase de alterações físicas e bioquímicas intensas no bago, com o aumento de volume e a formação e acumulação de compostos fenólicos na película, que poderão contribuir para o aumento da produção de ROS nesta fase. Acresce ainda o facto de que a POD é uma enzima localizada principalmente nas paredes celulares, local de formação de H_2O_2 (Mittler, 2002), pelo que na película do bago esta enzima pode ter um papel particularmente importante na remoção desta ROS, já que a película é constituída maioritariamente por células estruturantes, cuja parede celular é composta por três camadas distintas (Pinelo *et al.* 2006), conferindo a esta estrutura uma elevada complexidade e assumindo grande relevância nos processos fisiológicos que ocorrem neste material vegetal.

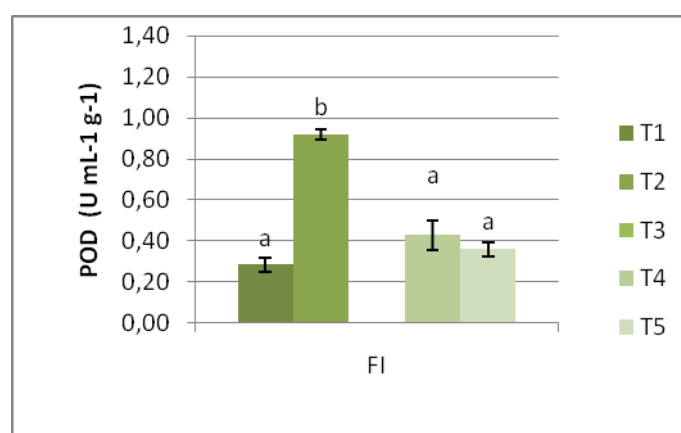
Uma comparação dos níveis enzimáticos dos diferentes regimes para os mesmos pontos permitem verificar que NI origina valores médios de actividade enzimática cerca de 1,2 vezes superior em RDI e de 1,4 vezes em FI, compatível com os maiores níveis de stresse provocados pelo regime NI, seguido de RDI e de FI, que induzem diferentes respostas nos mecanismos antioxidantes enzimáticos.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.1 – Actividade Enzimática da enzima POD ao longo do processo de maturação nos três regimes hídricos. (a) NI (b) RDI (c) FI. As barras representam as médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($P < 0,05$)

5.2 Polifenoloxidase (PPO)

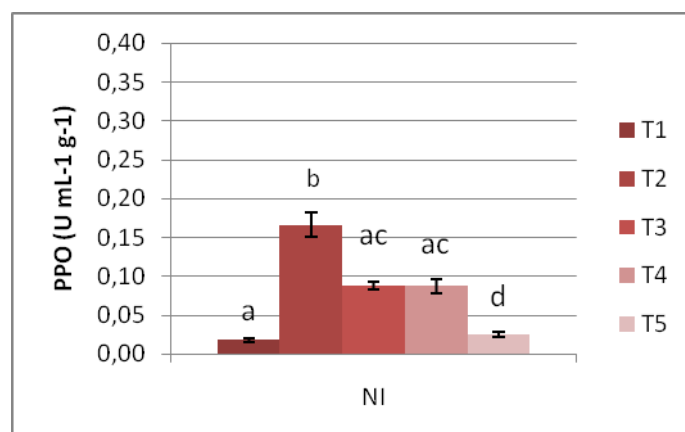
A actividade enzimática da PPO revelou diferenças no comportamento ao longo do tempo, em cada regime hídrico.

Apesar de existirem dois pontos em que não foi possível medição da actividade enzimática, o ponto T3 para o regime FI e o ponto T5 para o regime RDI, e que permitiriam uma mais segura análise do comportamento desta enzima ao longo do tempo, é possível verificar que a uma maturação mais elevada correspondem a níveis menores de actividade enzimática da PPO, o que parece ser consistente com todos os regimes hídricos.

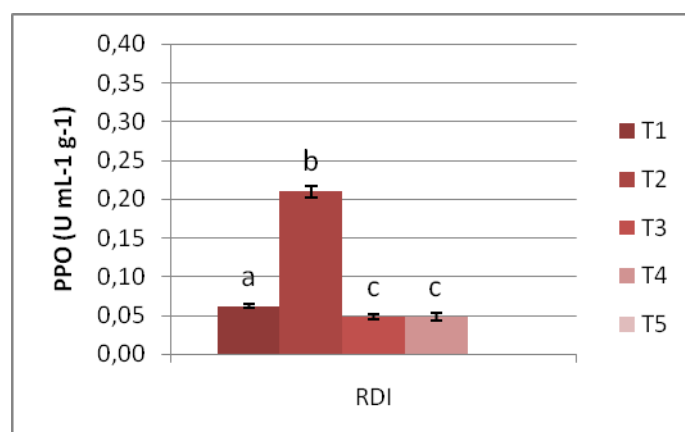
A actividade da enzima mostrou um comportamento semelhante nos regimes NI (**Figura 5.2 a**) e RDI (**Figura 5.2 b**), atingindo o seu valor máximo no ponto T2, em ambos os regimes. A ausência de dados no ponto T5 no regime RDI não permite uma análise mais consistente desta relação, contudo é possível admitir que esta tenha uma variação semelhante àquela observada para o regime NI.

Observou-se uma tendência para a diminuição da actividade ao longo do tempo no regime FI (**Figura 5.2 c**). Embora se tenha registado um aumento significativo de actividade no ponto T2 para os regimes NI e RDI, há posteriormente uma diminuição da actividade da PPO progressivamente em NI e de um modo mais constante em RDI. A actividade enzimática mais elevada foi registada em FI, no ponto T1. Em oposição, o valor de actividade enzimática mais baixo foi observado em NI, para o mesmo ponto.

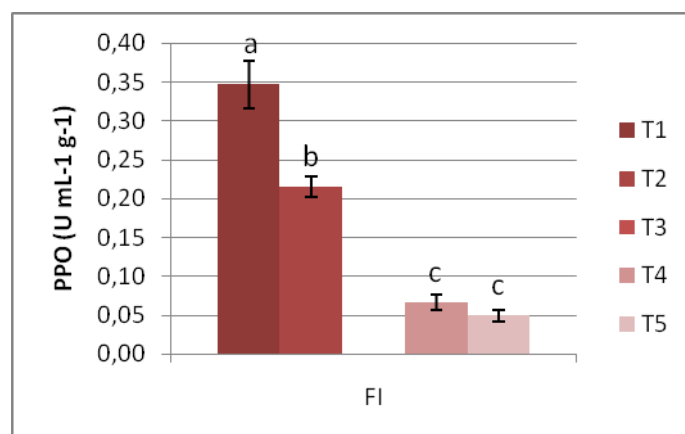
Os valores médios de actividade do regime FI foram 2 vezes superiores aos valores de RDI e 2,3 superiores a NI, para os mesmos pontos, revelando assim níveis de actividade da PPO mais baixos para estados de maturação mais avançados e, concomitantemente, para situações de maior stresse hídrico. Estes resultados estão de acordo com Amiot *et al.* (1997), que refere que a actividade da PPO varia inversamente com a sua solubilidade, atingindo o seu máximo nos primeiros estádios de desenvolvimento dos frutos, quando se encontra fortemente ligada à membrana tilacóide, e diminuindo a sua solubilidade, e consequentemente a sua actividade, com o avanço da maturação. Os resultados observados por Sofo *et al.* (2005), em tecidos foliares, em que se registou um decréscimo da actividade da enzima com o aumento do stresse hídrico ao longo do tempo, são também consistentes com estes resultados, uma vez que os menores valores de actividade foram registados para o regime NI, onde se terão verificado situações de stresse hídrico mais intensas, seguido de RDI e FI, este último onde o stresse hídrico terá sido menor.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.2 – Actividade Enzimática da enzima PPO ao longo do processo de maturação nos três regimes hídricos. (a) NI (b) RDI (c) FI. As barras representam as médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($P < 0,05$).

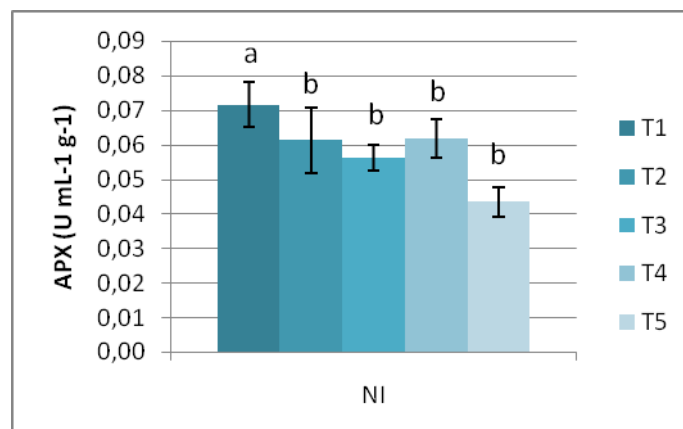
5.3 Ascorbato-peroxidase (APX)

Os resultados obtidos para a actividade enzimática da APX encontram-se representados na **Figura 5.3**. A actividade da enzima APX registou o seu máximo no ponto T1, verificando-se um decréscimo significativo em T2, para os três regimes hídricos em estudo, e revelando a partir daí uma tendência para a diminuição da actividade da enzima nos restantes pontos, ao longo do tempo. Contudo as diferenças observadas em NI (**Figura 5.3 a**) a partir do ponto T2 não foram estatisticamente significativas. Nos regimes RDI e FI (**Figura 5.3 b, 5.3 c**), observou-se uma tendência significativa para a diminuição da actividade a partir do ponto T2, registando-se um comportamento semelhante da actividade enzimática para os dois regimes. Novamente, a falta de dados nos pontos T3 e T5 em FI e RDI, respectivamente, não permitem a comparação efectiva dos resultados obtidos nestes regimes. Contudo, a observação de um comportamento semelhante para ambos os regimes permite supor que nestes pontos o valor de actividade acompanhe a tendência verificada. O regime NI apresentou valores médios de actividade enzimática cerca de 1,2 vezes superior a FI e 1,4 vezes superior a RDI, revelando mais uma vez que o regime NI foi, provavelmente, aquele em que se verificou um stress hídrico mais intenso.

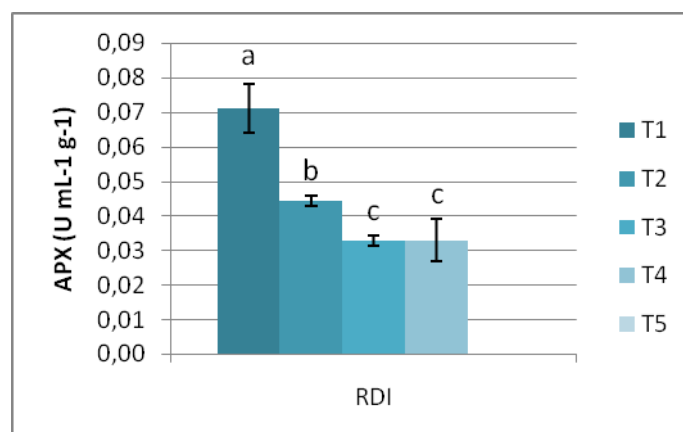
Em relação à função fisiológica desta enzima, nomeadamente em relação a situações de stresse hídrico, a APX utiliza o H_2O_2 como substrato pelo que é frequente verificar-se um aumento dos níveis de actividade desta enzima com correlação com possíveis aumentos deste composto. Contudo, segundo Mittler (2002) o H_2O_2 deverá estar mais associado a funções de sinalização, sendo menos eficiente na remoção desta espécie de ROS, comparativamente com a POD e CAT, por exemplo. Acresce ainda o facto de que os mecanismos enzimáticos estão muito condicionados pela compartimentação celular, tanto no que diz respeito à localização da enzima como dos processos que originam as diferentes tipos de ROS.

No caso das estruturas celulares da película verifica-se que os níveis de APX se mantêm constantes no regime NI, apresentam um ligeiro decréscimo em RDI, e um decréscimo mais acentuado em FI, o que leva a supor que a APX terá de facto uma função mais associada a sinalização de stresse ou à remoção de menores quantidades de ROS produzidos na fase inicial da maturação, em que o défice hídrico não é ainda tão elevado como na fase final da maturação. Esta relação está de acordo com os resultados expressos em **5.1**, em que a POD apresenta níveis de actividade mais baixos no início da maturação, actuando a APX também como mecanismo de remoção de H_2O_2 nessa fase. A remoção de maiores quantidades de H_2O_2 no final da maturação, será mais associada, neste caso à POD, como vimos anteriormente (**5.1**). Além disso, sendo a película uma estrutura com

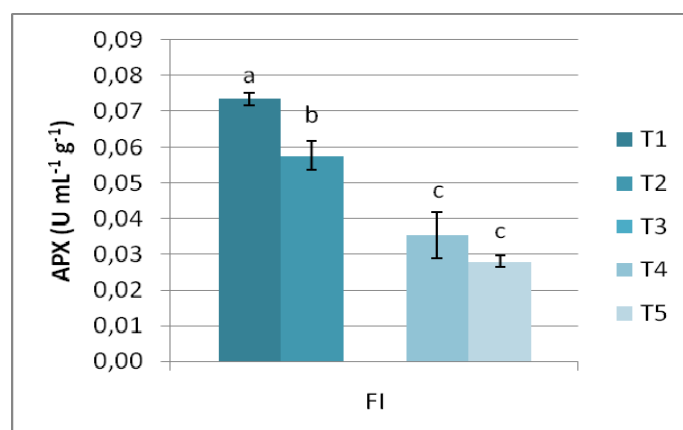
elevada proporção de materiais estruturais, é naturalmente mais preponderante a actividade da POD, que se encontra muito ligada às paredes celulares, enquanto que a APX está mais relacionada com processos metabólicos que ocorrem em cloroplastos, citosol, mitocondrias e peroxissomas. O facto de existir uma diminuição dos cloroplastos com a maturação pode também justificar a diminuição de APX que foi obtida para tempos de maturação mais elevados, o que se verificou para todos os regimes hídricos testados. Não foi possível efectuar a determinação do H_2O_2 , o que poderia esclarecer melhor esta função.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.3 – Actividade Enzimática da enzima APX ao longo do processo de maturação nos três regimes hídricos. (a) NI (b) RDI (c) FI. As barras representam as médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($P < 0,05$).

5.4 Glutathiona-redutase (GR)

A actividade da enzima GR (**Figura 5.4**) revelou um comportamento irregular ao longo do tempo, e para cada regime hídrico.

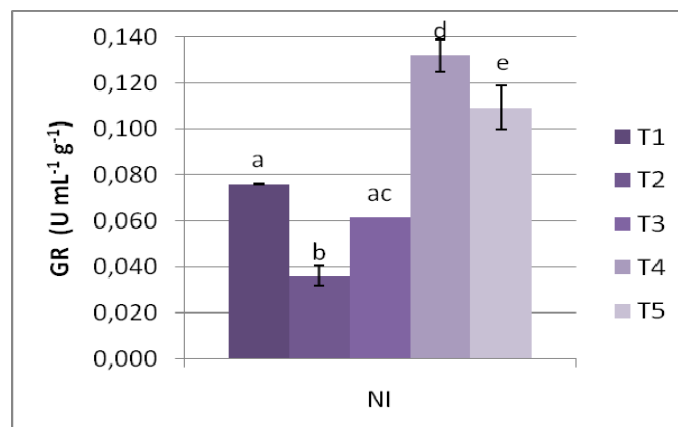
Em NI (**Figura 5.4 a**), registou-se uma diminuição significativa no ponto T2, relativamente aos pontos T1 e T3, que apresentaram valores de actividade estatisticamente semelhantes. O valor máximo de actividade foi detectado no ponto T4, verificando-se um decréscimo significativo em T5. Contudo, denota-se uma tendência para o aumento da actividade enzimática nos estados de maturação mais avançada.

No regime FI (**Figura 5.4 b**) não foi detectada actividade enzimática no ponto T1. Os pontos T2 e T4 não apresentaram diferenças significativas, pelo que a actividade enzimática se manteve em valores constantes neste período, observando-se um decréscimo significativo entre os pontos T4 e T5. Em RDI (**Figura 5.4 c**), observou-se um acréscimo significativo da actividade enzimática, comum aos pontos T2 e T3. Nos restantes pontos, a actividade enzimática assumiu valores estatisticamente semelhantes. Os níveis enzimáticos médios foram mais elevados em RDI, cerca de 1,3 vezes superior a NI e 2,1 vezes superior a FI, revelando que o stresse hídrico provocado por cada um dos regimes não estará na base dos níveis de actividade medidos, mas possivelmente na sua variação ao longo do tempo.

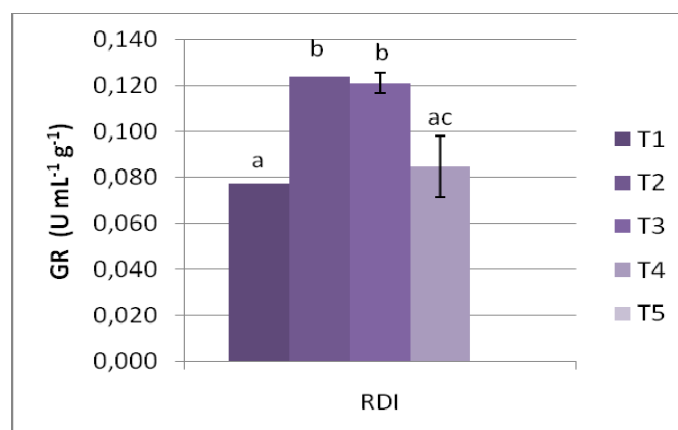
A discrepância existente entre o comportamento da GR e APX (**Figura 5.3**) parece indicar que a GR não estará, neste caso, relacionada com a regeneração do ascorbato pela via da glutathiona-ascorbato, podendo esta acção ser feita com maior expressão pela MDHAR, utilizando o NADPH como poder redutor.

No entanto, não se pode deixar de referir que os níveis de actividade da GR são mais elevados e significativamente diferentes para os tempos de maturação mais avançada no regime NI, encontrando-se um paralelismo em relação ao comportamento verificado para a POD. A semelhança observada entre os perfis de actividade enzimática da GR e da POD (5.1) nos três regimes hídricos em estudo poderão indicar que a GR actua principalmente na regeneração dos substratos utilizados pelas peroxidases, particularmente pela glutathiona-peroxidase (GPX), que é uma enzima semelhante à POD mas que utiliza electrões provenientes da GSH na redução do H_2O_2 a H_2O . Além disso, é referido por Mittler (2002) que a supressão da produção de CAT em plantas induz maior expressão dos níveis de GPX, o que poderá ter ocorrido nesta situação, uma vez que não foi detectada actividade da CAT no presente trabalho. Neste caso, a presença da GPX, essencialmente no citosol (Apel & Hirt, 2004) poderá contribuir para a remoção de H_2O_2 nesse local, complementando a acção da POD, que se localiza principalmente ao nível da parede celular, na remoção do

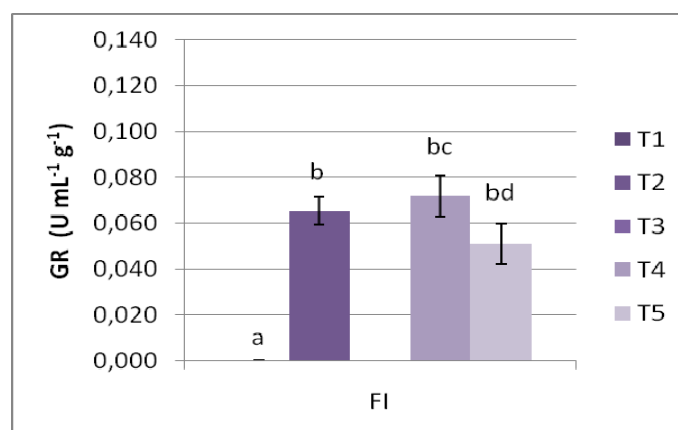
excesso de ROS formado no final da maturação. Este resultado é compatível com os estudos de Okuda & Yokotsuka (1999), que referem o aumento dos níveis de GR e GPX com o aumento dos teores de açúcar ao longo da maturação de bagos de uva, e ainda por Negri *et al.* (2008), que refere um claro aumento da expressão de GPX na película ao longo da maturação, em trabalhos de proteómica. No entanto, não foram efectuadas determinações da actividade enzimática da GPX e MDHAR, que seriam elucidativas neste sentido.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.4 – Actividade Enzimática da enzima GR ao longo do processo de maturação nos três regimes hídricos. (a) NI (b) RDI (c) FI. As barras representam as médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($P < 0,05$).

5.5 Catalase (CAT)

Neste estudo não foi detectada a actividade da CAT em nenhum dos regimes hídricos analisados, o que está em concordância com os estudos realizados por Okuda & Yokotsuka (1999) que referem também que a actividade desta enzima não foi detectada em bagos de uva das cultivares Koshu e Cabernet Sauvignon, embora neste caso se esteja a considerar a película do bago. Este resultado poderá estar relacionado com baixos níveis de actividade desta enzima nas células da película, que não permitam a sua detecção em ensaios laboratoriais. Contudo, esta enzima tem uma localização celular muito restrita, e nas plantas existe apenas nos peroxissomas associada ao metabolismo dos ácidos gordos. Não foi possível obter informação na bibliografia sobre a não existência destes organelos na película do bago, justificando a não detecção da CAT neste ensaio.

6. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos neste trabalho com película de bagos de *Vitis vinifera* L. da cultivar ‘Trincadeira’, pode concluir-se que cada um dos regimes hídricos em estudo – NI, RDI e FI – induzem comportamentos diferentes nas enzimas POD, PPO, APX, GR e CAT associadas aos mecanismos de resposta da planta ao stresse oxidativo:

- A POD parece constituir o agente principal de remoção de ROS, neste caso de H_2O_2 , uma vez que apresentou os níveis de actividade mais elevados ao longo do processo de maturação, para todos os regimes hídricos em estudo;
- A PPO apresentou níveis enzimáticos mais elevados nos primeiros estados de maturação, diminuindo depois com o aumento do estado de maturação e, concomitantemente, do stresse hídrico, em todos os regimes em estudo;
- A APX comportou um decréscimo ao longo do processo de maturação, mais acentuado em RDI e FI, que pode indiciar o seu papel na modulação de pequenas quantidades de ROS para efeitos de sinalização molecular na resposta a condições de stresse oxidativo e de eliminação de pequenas quantidades de H_2O_2 nos primeiros estados de maturação;
- A GR apresentou uma variação semelhante àquela observada para a POD, o que poderá indicar que nesta situação a enzima actua fundamentalmente na regeneração da GSH utilizada como substrato pela enzima GPX, uma peroxidase semelhante à POD, que actua na eliminação de H_2O_2 principalmente ao nível do citosol. A discrepância observada entre o comportamento da GR e APX parecem indicar que a GR não participa na regeneração do ascorbato, na via da glutathiona-asorbato;
- A CAT não foi detectada para nenhuma das amostras em estudo, o que se poderá dever aos baixos níveis de actividade que esta enzima assume na película ou mesmo à inexistência das estruturas em que se encontra naturalmente presente (peroxissomas).

A disponibilidade hídrica parece afectar a resposta da planta à acumulação de ROS em diferentes fases da maturação, observando-se uma resposta mais eficaz, traduzida pelo aumento dos níveis de POD e GR, na fase final da maturação no regime NI e na fase do *pintor* para os regimes RDI e FI, o que pode indicar o maior investimento da planta na fase final do ciclo reprodutivo em condições limitantes da disponibilidade de água.

A avaliação dos níveis enzimáticos dos diferentes regimes permite observar que o regime NI foi aquele em que se registaram níveis enzimáticos mais elevados para as enzimas POD e APX, o que poderá indicar que foi neste regime que se verificou maior incidência de stresse oxidativo, uma vez que estas enzimas estão directamente relacionadas com a remoção do excesso de ROS verificado nessas condições, tal como foi referido anteriormente. No entanto, as diferenças observadas entre os regimes RDI e FI não permitem tirar conclusões acerca do stresse oxidativo provocado por estes regimes, uma vez que os resultados não foram explícitos neste sentido. Contudo, se considerarmos que a POD representa o principal agente de remoção do excesso de ROS no caso particular da película, então o regime FI será aquele em que os danos oxidativos terão provavelmente uma menor expressão, uma vez que apresentou os níveis enzimáticos médios mais baixos para esta enzima. Neste sentido, o regime RDI apresentou valores médios de actividade intermédios aos restantes regimes. Assim, e tal como esperado, os maiores níveis de stresse hídrico provocados pelo regime NI originaram possivelmente maior stresse oxidativo, seguido do regime RDI e FI, a que correspondem níveis de stresse hídrico respectivamente inferiores.

Este trabalho constitui uma contribuição para o estudo global sobre as alterações que ocorrem na película do bago de uva ao longo do processo de maturação, cuja interpretação não poderá nunca ser dissociada do efeito de todos os factores que influenciam o seu desenvolvimento, nomeadamente o regime hídrico a que está sujeito, dada a sua influência no processo de maturação e desenvolvimento do bago. Foi nesta óptica que se realizou este trabalho, integrado num projecto em que é abordada a problemática da fisiologia da videira e a qualidade dos produtos resultantes desta fileira, nomeadamente o vinho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. E.** (1983) Catalase. Hydrogen-peroxide: hydrogen-peroxide oxidoreductase E.C. 1.11.1.6. em *Methods of Enzymatic Analysis*. H. U. Bergmeyer (ed.) Vol. III. Enzymes I: Oxidoreductases, Transferases. Verlag Chemie, Weinheim, pp 273-286.
- Ali, M. B., Yu, K., Hahn, E. & Paek, K.** (2005). Differential responses of anti-oxidants enzymes, lipoxygenase activity, ascorbate content and the production of saponins in tissue cultured root of mountain Panax ginseng C.A. Mayer and Panax quinquefolium L. in bioreactor subjected to methyl jasmonate stress. *Plant Science* **169**: 83-92.
- Amiot, M. J., Fleuriet, A., Cheynier, V. & Nicolas, J.** (1997). Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables, Cap. 4 em *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*. F. A. Tomás-Barberán, R. J. Robins (ed.), Proceedings of the Phytochemistry Society of Europe, Oxford Science Publications, Clarendon Press, pp. 51-85.
- Apel, K., & Hirt, H.** (2004). Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373-399.
- Asada, K.** (1992). Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* **85**: 235–241.
- Asada, K.** (1999). The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 601–639.
- Baker, N. R.** (1991) A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum* **81**: 563–570.
- Bartoli, C.G., Simontacchi, M., Tambussi, E., Beltrano, J., Montaldi, E. & Puntarulo, S.** (1999) Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. *Journal of Experimental Botany* **50**: 375–383.
- Biehler, K. & Fock, H.** (1996). Evidence for the Contribution of the Mehler-Peroxidase Reaction in Dissipating Excess Electrons in Drought-Stressed Wheat. *Plant Physiology* **112**: 265-272.

Bradford, M. M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 319–321.

Bowler, C., Van Montagu, M. & Inze, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**: 83–116.

Chalmers, D. J., Mitchell, P. D. & van Heek, L. (1981). Control of peach tree growth and productivity by regulated water supply, tree density and summer pruning. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **106**: 307–312.

Chaves, M. M., Maroco, J. P. & Pereira, J.S. (2003). Understanding plant response to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* **30**: 239-264.

Chaves, M. M. & Oliveira, M. M. (2004). Mechanism underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany* Vol. 55, No. 407, Water-Saving in Agriculture Special Issue, pp. 2365–2384.

Chaves, M. M., Pereira, J. S., Maroco, J., Rodrigues, M. L., Ricardo, C. P. P., Osório, M. L., Carvalho, I., Faria, T. & Pinheiro, C. (2002). How Plants Cope with Water Stress in the Field. Photosynthesis and Growth. *Annals of Botany* **89**: 907-916.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**: 779–795.

Del Longo, O. T., González, C. A., Pastori, G. M. & Trippi, V. S. (1993). Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant and Cell Physiology* **34**: 1023–1028.

Demiral, T. & Türkan, I. (2005). Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany* **53**: 247-257.

Dry, P. R., Loveys, B. R. & Stoll, M. (2001). Strategic management in Australian vineyards. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **35**: 129-139.

Fereres, E. & Evans, R. G. (2006). Irrigation of fruit trees and vines: an introduction. *Irrigation Science* **24**: 55–57.

Fereres, E. & Soriano, M. A. (2006). Deficit Irrigation for reducing agricultural water use. *Journal of Experimental Botany* **58**: 147-159.

Flexas, J., Badger, M., Chow, W. S., Medrano, H. & Osmond, C. B. (1999). Analysis of the Relative Increase in Photosynthetic O₂ Uptake When Photosynthesis in Grapevine Leaves Is Inhibited following Low Night Temperatures and/or Water Stress. *Plant Physiology* **121**: 675-684.

Foyer, C. H., Descourvieres, P. & Kunert, K. J. (1994). Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* **17**: 507–523.

Foyer, C. H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. F. & Scott, I. M. (1997). Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* **100**: 241–254.

Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J. & Azevedo, R. A. (2005). Making the life of heavy metal stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* **32**: 481-494.

Hammond-Kosack, K. E. & Jones, J. D. G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**:1773–1791.

Jackson, R. B., Sperry, J. S. & Dawson, T. E. (2000). Root water uptake and transport: using physiological processes in global predictions. *Trends in Plant Science* **5**: 482-488.

Jiménez, A., Hernandez, J. A., del Rio, L. A. & Sevilla, F. (1997). Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology* **114**: 275–84

Karpinski, S., Escobar, C., Karpinska, B., Creissen, G. & Mullineaux, P. M. (1997) Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *Plant Cell* **9**: 627–640.

-
- Knox, J. P. & Dodge, A. D.** (1985). Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry* **24**: 889–896.
- Kuwabara, T. & Katoh, Y.** (1999). Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant and Cell Physiology* **40**: 1029-1035.
- Lascano, H. R., Antonicelli, G. E., Luna, C. M., Melchiorre, M. N., Gómez, L. D., Racca, R. W., Trippi, V. S. & Casano, L. M.** (2001). Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and *in vitro* studies. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**: 1095–1102.
- Lecas, M. & Brillouet, J. M.** (1994). Cell wall composition of grape berry skins. *Phytochemistry* **35**: 1241-1243.
- Lester, G. E., Hodges, D. M., Meyer, R. D. & Munro, K. D.** (2004). Pre-extraction Preparation (Fresh, Frozen, Freeze-Dried, or Acetone Powdered) and Long-Term Storage of Fruit and Vegetable Tissues: Effects on Antioxidant Enzyme Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 2167-2173.
- Maroco, J. P., Rodrigues, M. L., Lopes, C. & Chaves, M. M.** (2002). Limitations to leaf photosynthesis in field-grown grapevine under drought – metabolic and modeling approaches. *Functional Plant Biology* **29**: 451-459.
- Martins, L. L. & Mourato, M. P.** (2008). Alterações no metabolismo de plantas em meios contaminados por metais pesados: stresse oxidativo. *Revista Agros* **8**.
- McCarthy, M. G., Loveys, B. R., Dry, P. R. & Stoll, M.** (2002). Regulated deficit irrigation and partial rootzone drying as irrigation management techniques for grapevines em *Deficit Irrigation practices*, FAO Water Reports No. 22. Rome, Italy. FAO, pp. 79-87.
- Medrano, H., Escalona, J. M., Bota, J., Gulías, J. & Flexas, J.** (2002). Regulation of Photosynthesis in C₃ Plants in Response to Progressive Drought: Stomatal Conductance as a Reference Parameter. *Annals of Botany* **89**: 895-905.
- Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H.G. & Foyer, C.H.** (1995). Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Letters* **378**: 203-206.

-
- Mitchell, P. D. & Chalmers, D. J.** (1982). The effect of reduced water supply on peach tree growth and yields. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **107**: 853–856.
- Mithofer, A., Shulze, B. & Boland, W.** (2004). Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters* **566**: 1-5.
- Mittler, R.** (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405-410.
- Moller, I. M., Jensen, P. E. & Hansson, A.** (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 459-481.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E. & Jacquot, J. P.** (2007). Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* **129**: 185-195.
- Negri, A. F., Prinsi, B., Rossoni, M., Failla, O., Scienza, A., Cocucci, M. & Espen, L.** (2008). Proteome changes in the skin of the grape cultivar Barbera among different stages of ripening. *BMC Genomics* **9**: 378.
- Noctor, G. & Foyer, C. H.** (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249-279.
- Oktay, M., Küfreviölu, I., Kocaçaliskan, I. & Sakirolu, H.** (1995). Polyphenoloxidase from Amasya Apple. *Journal of Food and Science* **60**: 494-496.
- Okuda, T. & Yokotsuka, K.** (1999). Levels of glutathione and activities of related enzymes during ripening of Koshu and Cabernet Sauvignon grapes and during winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture* **50**: 264-270.
- Pacheco, C. A., Dias, A. C., Dias, P. S. S., Boteta, L. M. L. & Silvestre, J.** (2007). Rega Deficitária na Vinha: Produção e Gestão da Rega. *II Congresso Nacional de Rega e Drenagem*, Fundão.
- Pastori, G. M. & Trippi, V. S.** (1993). Antioxidative protection in a drought-resistant maize strain during leaf senescence. *Physiologia Plantarum* **87**: 227–231.

Pilati, S., Perazzolli, M., Malossini, A., Cestaro, A., Demattè, L., Fontna, P., Dal Ri, A., Viola, R., Velasco, R. & Moser, C. (2007). Genome-wide transcriptional analysis of grapevine berry ripening reveals a set of genes similarly modulated during three seasons and the occurrence of an oxidative burst at véraison. *BMC Genomics* **8**: 428.

Pinelo, M., Arnous, A. & Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology* **17**: 579-590.

Polle, A. (2001). Dissecting the superoxide dismutase–ascorbate peroxidase–glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology* **126**: 445–462.

Price, N. C. (1992). Techniques for enzyme extraction, Cap. 9 em *Enzyme Assays*. R. Eienthal, M. J. Danson (ed.), The Practical Approach Series, Series Editors D. Rickwood, B. D. Hames, IRL Press, pp 255-275.

Ramanjulu, S. & Bartels, D. (2002). Drought and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell and Environment* **25**: 141-151.

Reynier, A. (1986). *Manual de Viticultura*. Terceira Edição. Euroagro, Publicações Europa-América.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. & Lonvaud, A. (2006). HandBook of Enology Vol. I. The Microbiology of Wine and Vinifications. Second Edition, John Wiley & Sons, Ltd., England.

Ricardo, C. P. & Teixeira, A. N. (1979). *Enzimas*. Didáctica Editora.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* **2**: 152-159.

Shanker, A., Djanaguiraman, M., Sudhagar, R., Chaundrashekar, C. N. & Pathmanabhan, G. (2004). Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. cv CO 4) roots. *Plant Science* **166**: 1035-1043.

Smirnoff, N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* **125**: 27–58.

Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C. & Masia, A. (2005). Antioxidant defences in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology* **32**: 45-53.

Souza, C. R. (2004). Leaf and berry metabolism of field-grown grapevines (*Vitis vinifera*) under different irrigation systems. *Tese de Doutorado em Engenharia Agronômica*, UTL-ISA.

Sutherland, M. W. (1991). The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **39**: 79–93.

Taiz, L. & Zeiger, E. (1992). *Plant Physiology*. Second edition, Sinauer Associates, Inc. Publ.

Tang, W. & Newton, R. J. (2005). Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 760-769.

Vangronsveld, J. & Clijsters, H. (1994). Toxic effects of metals. In *Plants and the chemical elements. Biochemistry, uptake, tolerance and toxicity*, ed. M. E. Farago, 149-177. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.

Willekens, H., Inzé, D., van Montagu, M. & van Camp, W. (1995). Catalase in plants. *Molecular Breeding* **1**: 207-228.

ANEXO

Caracterização do estado de maturação do bago

Amostra		° Brix	Acidez titulável (equivalente de Ácido Tartárico)
T1	NI	4,8	32,08
	RDI	4,2	32,25
	FI	4,6	34,52
T2	NI	9,9	21,02
	RDI	8,9	27,60
	FI	8,7	22,69
T3	NI	13,2	11,42
	RDI	11,4	13,60
	FI	10,0	16,50
T4	NI	11,8	13,50
	RDI	13,9	10,65
	FI	11,6	11,55
T5	NI	16,0	8,39
	RDI	15,1	8,62
	FI	15	8,02

(Dados gentilmente cedidos pelo Laboratório de Ecofisiologia Molecular – ITQB)